

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CINTIA DELAI DA SILVA HORINOUCI

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DE *Vochysia bifalcata* Warm.:
POTENCIAL TERAPÊUTICO PARA UMA ESPÉCIE DE REFLORESTAMENTO.

CURITIBA

2013

CINTIA DELAI DA SILVA HORINOUCI

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DE *Vochysia bifalcata* Warm.:
POTENCIAL TERAPÊUTICO PARA UMA ESPÉCIE DE REFLORESTAMENTO.

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, no
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

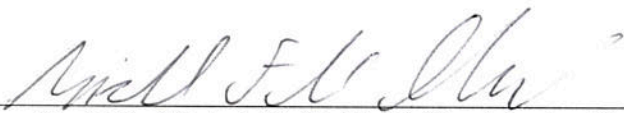
Orientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki
Coorientadora: Prof. Dra. Daniela de Almeida Cabrini

CURITIBA

2013

ATA DO JULGAMENTO DA 20ª DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

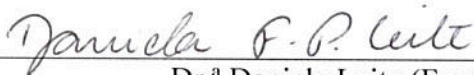
Ao vigésimo sexto dia do mês de junho do ano de dois mil e treze, às nove horas, no Anfiteatro nº 10 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, de autoria da pós-graduanda **CÍNTIA DELAI DA SILVA HORINOCHI**, intitulada "Atividade Anti-Inflamatória Tópica de *Vochysia bifalcata* Warm.: Potencial Terapêutico para uma Espécie de Reflorestamento", sob orientação do Prof. Dr. Michel Fleith Otuki e banca composta pelos professores: Prof.^a Dr.^a Carolina Camargo de Oliveira (Biologia Celular – UFPR), Dr.^a Daniela Leite (Fundação Certi - UFSC), Prof.^a Dr.^a Irinéia Paulina Baretta (Instituto de Ciências Biológicas, Médicas e da Saúde – UNIPAR) e Prof.^a Dr.^a Maria Fernanda de Paula Werner (Farmacologia – UFPR). A Banca Examinadora iniciou os trabalhos e a candidata teve quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida arguida durante quinze minutos por cada um dos membros da Banca, e tendo trinta minutos para responder a cada uma das arguições. No final a Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer: favorável. De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi aprovada. Para a publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por seu orientador. Nada mais havendo a tratar, o Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada pelo Presidente e pelos demais membros da banca examinadora, em Curitiba, 26 de junho de 2013.



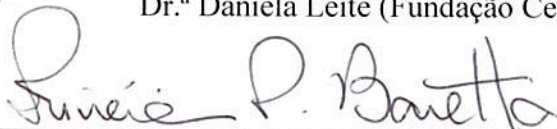
Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Presidente - Farmacologia - UFPR)



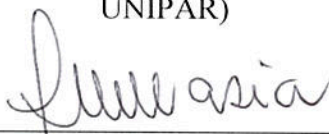
Prof.ª Dr.ª Carolina Camargo de Oliveira (Biologia Celular – UFPR)



Dr.ª Daniela Leite (Fundação Certi - UFSC)




Prof.ª Dr.ª Irinéia Paulina Baretta (Instituto de Ciências Biológicas, Médicas e da Saúde – UNIPAR)



Prof.ª Dr.ª Maria Fernanda de Paula Werner (Farmacologia – UFPR)

PARECER

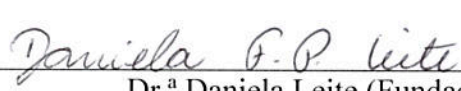
A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado intitulada “Atividade Anti-Inflamatória Tópica de *Vochysia bifalcata* Warm.: Potencial Terapêutico para uma Espécie de Reflorestamento”, de autoria da pós-graduanda **CÍNTIA DELAI DA SILVA HORINOUCI**, sob orientação do Prof. Dr. Michel Fleith Otuki e banca composta pelos professores: Prof.^a Dr.^a Carolina Camargo de Oliveira (Biologia Celular – UFPR), Dr.^a Daniela Leite (Fundação Certi - UFSC), Prof.^a Dr.^a Irinéia Paulina Baretta (Instituto de Ciências Biológicas, Médicas e da Saúde – UNIPAR) e Prof.^a Dr.^a Maria Fernanda de Paula Werner (Farmacologia – UFPR), reuniu-se e de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi aprovada. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pelo seu orientador. Em Curitiba, 26 de junho de 2013.



Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Presidente - Farmacologia - UFPR)



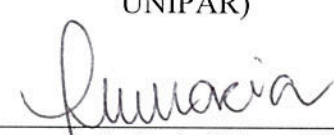
Prof.ª Dr.ª Carolina Camargo de Oliveira (Biologia Celular – UFPR)



Dr.ª Daniela Leite (Fundação Certi - UFSC)



Prof.ª Dr.ª Irinéia Paulina Baretta (Instituto de Ciências Biológicas, Médicas e da Saúde – UNIPAR)



Prof.ª Dr.ª Maria Fernanda de Paula Werner (Farmacologia – UFPR)

Ao meu amado Frank, pelo amor, compreensão,
respeito e incentivo incondicionais.
Aos meus pais Elizeu e Amália, pelo amor e confiança
inabaláveis e pelo colo sempre pronto.
Aos meus irmãos Bruno e Débora, pelo amor,
cumplicidade e apoio constantes.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir desfrutar de uma vida esplendorosa e por me conceder dons precisos.

Aos meus orientadores Michel Fleith Otuki e Daniela de Almeida Cabrini, que com competência e dedicação me mostraram os melhores caminhos a seguir. Obrigada pelas oportunidades oferecidas e pela confiança em mim depositada.

Aos meus amigos de laboratório, pelo incentivo e ajuda, mas principalmente pela amizade e cumplicidade. Arthur, Bruno, Camila, Daniel, Diego, Graziela, Luise, Priscila, Shirley e Verlaine, vocês foram essenciais e fizeram toda a diferença.

A minha querida amiga Bruna Soley, pela ajuda incansável na realização desse trabalho e pela amizade sincera.

Ao Prof. Dr. Jamil Assreuy pela colaboração na realização do experimento de ligação específica.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pelos ensinamentos e atenção valiosos.

Aos servidores do Departamento e todos os colegas de pós-graduação.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse projeto.

*As nuvens mudam sempre de posição,
mas são sempre nuvens no céu.
Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém, leais
com o que pensamos e sonhamos;
lembre-se, tudo se desmancha no ar,
menos os pensamentos.*

Paulo Baleki

RESUMO

Vochysia bifalcata é uma árvore brasileira nativa, abundantemente encontrada no litoral do Paraná, onde tem forte valor socioeconômico, uma vez que é uma espécie utilizada para reflorestamento além de sua madeira ter grande valor na marcenaria regional. Apesar de outras plantas do gênero *Vochysia* demonstrarem atividade biológica, não existem dados a respeito de *V. bifalcata*. Assim, nesse trabalho, o extrato hidroalcoólico das folhas da *V. bifalcata* (EHVB) foi avaliado em modelos de inflamação cutânea, no intuito de considerar as folhas dessa árvore como uma potencial fonte de extração de droga vegetal para o desenvolvimento de um fitoterápico. A aplicação tópica do EHVB reduziu significativamente o edema de orelha induzido pela aplicação dos agentes flogísticos óleo de cróton, TPA e fenol. Além disso, o extrato foi capaz de reduzir a migração leucocitária para o foco inflamatório tanto no modelo de inflamação cutânea aguda quanto no crônico. A atividade anti-inflamatória do extrato foi também evidenciada pela redução dos níveis teciduais das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6 induzidas pela aplicação tópica de TPA. Além do efeito anti-inflamatório, no modelo de inflamação crônica o EHVB promoveu redução da hiperproliferação epidérmica com inibição da expressão do marcador de proliferação PCNA. Entretanto, o EHVB não foi capaz de inibir a proliferação de queratinócitos *in vitro* nem ao menos alterar a expressão do marcador de proliferação Ki-67, sugerindo que a atividade antiproliferativa, seja provavelmente derivada do efeito anti-inflamatório do EHVB. A investigação de um possível mecanismo de ação demonstrou que o EHVB atua através de receptores de glicocorticoides, o que foi evidenciado pela reversão do efeito do EHVB através do antagonista de receptores de glicocorticoide, mifepristona e também através do ensaio de ligação específica da [3H]-dexametasona. Apesar de exibir um efeito anti-inflamatório do tipo glicocorticoide o EHVB não promoveu o aparecimento de efeitos adversos quando aplicado por via tópica, ao contrário da dexametasona, a qual promoveu, atrofia cutânea, diminuição no peso da adrenal, timo e baço e ainda atraso no processo cicatricial da pele. Os resultados demonstrados sugerem que as folhas de *V. bifalcata* tem um grande potencial como fonte de desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos com atividade anti-inflamatória e antiproliferativa. Ainda, o uso racional dessa planta na indústria farmacêutica agrega valor considerável a essa espécie de grande importância econômica, social e ecológica.

Palavras-chave: *Vochysia bifalcata*. Vochysiaceae. Inflamação cutânea. Edema de orelha. Hiperproliferação. Queratinócito. Receptor de glicocorticoide.

ABSTRACT

Vochysia bifalcata is a native Brazilian tree profusely found at Paraná coast, where it has a great social and economic value, since it is used in reforestation. Also its white wood is quite appreciated by local sawmills. Although other *Vochysia* species show biological activity, there are no reports about *V. bifalcata*. So, in this work the extract from leaves of *V. bifalcata* (EHVB) was evaluated in skin inflammation models, in order to consider the tree leaves as a potential source of raw material to the development of an herbal drug. Topical application of EHVB significantly reduced the ear edema formation induced by application of phlogistic agents such as croton oil, TPA or phenol. Besides, EHVB was also able to reduce leukocyte migration to the inflammation focus both in acute and in chronic inflammation models. Anti-inflammatory activity was also evidenced by reduction of tissue levels of inflammatory cytokines TNF- α e IL-6 induced by TPA. Beyond the anti-inflammatory effect, in the chronic inflammation model, EHVB promoted reduction of the epidermal hyperproliferation with inhibition of the expression of the cell proliferation marker, PCNA. However, EHVB was not effective in inhibit keratinocyte proliferation *in vitro*, analyzed by the expression of Ki-67, a cell proliferation marker, suggesting that the antiproliferative activity is probably derived from the EHVB anti-inflammatory effects. The investigation of a possible mechanism of action revealed that EHVB acts through of glucocorticoids receptors, as evidenced by the reversal of the EHVB effect by the glucocorticoid antagonist mifepristone, and also through a ligand binding assay with [3 H]-dexamethasone. Although EHVB show a corticoid-like effect, it did not promote the emergence of side effects when topically applied. In the other way, dexamethasone, a reference corticoid drug, triggered skin atrophy, decreased adrenal, thymus and spleen weight, and also delayed skin wound healing. Together these results suggest that the *V. bifalcata* leaves have a great potential as a source for an herbal drug with anti-inflammatory and antiproliferative activities. Also, the rational usage of this plant in the pharmaceutical industry could aggregates estimable value to this specie which has great social, economic and ecological importance.

Key-words: *Vochysia bifalcata*. Vochysiaceae. Skin inflammation. Ear edema. Hyperproliferation. Keratinocyte. Glucocorticoid receptor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Guaricica (<i>V. bifalcata</i> Warm.)	28
Figura 2 -	Estrutura da pele humana.....	32
Figura 3 -	Hipótese	39
Figura 4 -	Curva dose-resposta do EHVB no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	55
Figura 5 -	Efeito do tratamento tópico com EHVB sobre a atividade da MPO	56
Figura 6 -	Efeito direto do EHVB sobre a atividade da enzima MPO <i>in vitro</i>	57
Figura 7 -	Fotos representativas dos cortes histológicos das orelhas dos camundogos desafiadas com óleo de cróton e tratadas com EHVB e dexametasona.....	58
Figura 8 -	Efeito do EHVB e da dexametasona sobre a migração celular induzida pela aplicação tópica de óleo de cróton	59
Figura 9 -	Efeito do EHVB e da dexametasona sobre a liberação de TNF- α induzida por TPA.....	60
Figura 10 -	Efeito do EHVB e da dexametasona sobre a liberação de IL-6 induzida por TPA.....	61
Figura 11 -	Efeito do EHVB administrado por via oral no modelo de edema de orelha induzido por TPA.....	62
Figura 12 -	Efeito do tratamento por via oral com EHVB sobre a atividade da MPO.....	63
Figura 13 -	Efeito antiedematogênico do EHVB no modelo de edema de orelha induzido por fenol.....	64
Figura 14 -	Efeito do EHVB no edema induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton.....	65
Figura 15 -	Efeito do EHVB sobre o aumento no peso das orelhas induzido por óleo de cróton.....	66
Figura 16 -	Efeito do EHVB e da dexametasona aplicados por via tópica na atividade da enzima MPO induzida pela aplicação múltipla de óleo de cróton.....	67
Figura 17 -	Efeito do EHVB e da dexametasona aplicados por via tópica na	

	atividade da enzima NAG induzida pela aplicação múltipla de óleo de cróton.....	68
Figura 18 -	Efeito direto do EHVB sobre a atividade da enzima NAG <i>in vitro</i>	69
Figura 19 -	Fotos representativas dos cortes histológicos das orelhas dos camundongos desafiadas pela aplicação repetida de óleo de cróton e tratadas com EHVB e dexametasona.....	70
Figura 20 -	Efeito do EHVB e da dexametasona sobre a migração leucocitária induzida pela aplicação múltipla de óleo de cróton....	71
Figura 21 -	Efeito do EHVB sobre a hiperproliferação epidérmica no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton.....	72
Figura 22 -	Fotos representativas da análise imunohistoquímica dos cortes histológicos de orelhas de camundongos.....	73
Figura 23 -	Efeito do EHVB e da dexametasona sobre a hiperproliferação epidermal induzida pela aplicação múltipla de óleo de cróton.....	74
Figura 24 -	Efeito do EHVB na viabilidade de células HaCaT.....	75
Figura 25 -	Efeito do EHVB sobre a proliferação de células HaCaT.....	76
Figura 26 -	Efeito da associação de EHVB e dexametasona administrados por via tópica no edema de orelha induzido pela aplicação de TPA.....	77
Figura 27 -	Efeito da associação de EHVB e dexametasona administrados por via tópica sobre a atividade da enzima MPO	78
Figura 28 -	Reversão da atividade antiedematogênica de EHVB e dexametasona pela mifepristona.....	79
Figura 29 -	Efeito da mifepristona sobre a atividade inibitória do EHVB e dexametasona sobre a atividade da MPO.....	80
Figura 30 -	Efeito do EHVB sobre a capacidade de ligação da [³ H]-dexametasona ao receptor de glicocorticoide.....	81
Figura 31 -	Efeito do EHVB e da dexametasona sobre o peso corporal dos animais.....	82
Figura 32 -	Atrofia cutânea induzida por dexametasona.....	83
Figura 33 -	Fotos representativas dos cortes histológicos das orelhas dos camundongos submetidos ao ensaio de atrofia cutânea.....	84

Figura 34 -	Atrofia da derme induzida pela aplicação de corticoide tópico.....	85
Figura 35 -	Fotos representativas das adrenais, baço e timo de animais tratados com EHVB ou dexametasona.....	86
Figura 36 -	Efeito do EHVB e da dexametasona sobre o peso das adrenais..	87
Figura 37 -	Efeito do EHVB e da dexametasona sobre o peso do baço.....	87
Figura 38 -	Efeito do EHVB e da dexametasona sobre o peso do timo.....	88
Figura 39 -	Efeito do EHVB e dexametasona na cicatrização de lesão por excisão.....	89
Figura 40 -	Efeito do EHVB e da dexametasona aplicados por via tópica no modelo de cicatrização por excisão.....	90

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	-	MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS INCLUÍDOS NA RENAME.....	18
TABELA 2	-	CATEGORIAS TERAPÊUTICAS PARA FITOTERÁPICOS...	19
TABELA 3	-	PLANTAS MEDICINAIS SELVAGENS E CULTIVADAS: VANTAGENS E DESVANTAGENS	25
TABELA 4	-	ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Vochysia</i>	29
TABELA 5	-	ETAPAS DA PREPARAÇÃO DE CORTES HISTOLÓGICOS	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	-	Análise de Variância
ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	-	proteína ativadora
APC	-	células apresentadoras de antígeno
BSA	-	albumina de soro bovino
COX	-	ciclooxigenase
DAB	-	Diaminobenzidina
Dexa	-	Dexametasona
DMEM	-	Meio dulbecco mem
EDTA	-	ácido etilenodiaminotetracético
EHVB	-	extrato hidroalcoólico das folhas da <i>V. bifalcata</i>
ELISA	-	Ensaio Imunoadsorvente Ligado à Enzima
EPM	-	erro padrão da média
ERO	-	espécies reativas de oxigênio
G-CSF	-	fator estimulante de colônia de granulócito
GM-CSF	-	fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos
HE	-	hematoxilina e eosina
HTAB	-	Hexadeciltrimetilamônio
ICAM-1	-	molécula de adesão intercelular-1
IL	-	Interleucina
IL-6R	-	receptor de interleucina-6
INF	-	Interferona
iNOS	-	óxido nítrico sintase induzida
JAK	-	Janus quinase
LIF	-	fator inibitório de leucemia
LPS	-	lipopolissacarídeo de membrana de bactérias
LT	-	Leucotrienos
MAPK	-	proteínas quinase ativadas por mitógeno
MCP-1	-	proteína quimiotática de monócitos
MPO	-	Mieloperoxidase
MTT	-	brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

NADPH	- nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NAG	- n-acetil- β -D glucosaminidase
NF- κ B	- fator nuclear kappa B
NIQFAR	- Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas
NO	- óxido nítrico
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PCNA	- antígeno nuclear de proliferação celular
PG	- Prostaglandinas
PI3K	- fosfatidilinositol-3-quinase
PLA ₂	- fosfolipase A ₂
PMSF	- fluoreto de fenilmetilsulfonil
RENAME	- Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
s.c.	- via subcutânea
SFB	- soro fetal bovino
SPVS	- Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental
STAT3	- transdutor de sinal e ativador de transcrição-3
SUS	- Sistema Único de Saúde
TGF	- fator de crescimento transformante
TMB	- Tetrametilbenzidina
TNF- α	- fator de necrose tumoral- α
TPA	- 12-O-tetradecanoilforbol acetato
VCAM-1	- molécula de adesão de células vasculares-1
VEGF	- fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
1.1 Uso de plantas medicinais como estratégia terapêutica.....	16
1.2 Medicamentos fitoterápicos.....	17
1.3 Limitações da fitoterapia: qualidade, eficácia e segurança.....	21
1.4 Otimização do manejo de fitoterápicos no contexto da cadeia produtiva.....	24
1.5 <i>Vochysia bifalcata</i> Warm. – uma espécie promissora.....	26
1.6 Inflamação cutânea como ferramenta de estudo.....	30
2 JUSTIFICATIVA.....	38
3 HIPÓTESE.....	39
4 OBJETIVOS.....	40
4.1 Objetivo Geral.....	40
4.2 Objetivos Específicos.....	40
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
5.1 Material botânico.....	41
5.2 Obtenção do Extrato.....	41
5.3 Animais.....	42
5.4 Drogas e Reagentes.....	42
5.5 Modelo de Edema de Orelha.....	43
5.6 Dermatite de contato irritativa induzida por óleo de cróton ou TPA.....	44
5.7 Dermatite de Contato Irritativa Induzida pela Aplicação Tópica de Fenol.....	45
5.8 Inflamação cutânea induzida pela aplicação repetida de óleo de cróton.....	45
5.9 Atrofia cutânea induzida por tratamento tópico com glicocorticoide.....	46
5.10 Avaliação da Cicatrização pelo Método de Excisão.....	46
5.11 Avaliação da Atividade Enzimática da MPO e da NAG.....	47
5.12 Avaliação dos níveis das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6.....	48
5.13 Avaliação do tecido cutâneo através de análise histológica.....	49
5.14 Verificação da expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA).....	50
5.15 Ensaio de ligação de receptores de glicocorticoide.....	51
5.16 Cultivo Celular.....	52
5.17 Avaliação da Viabilidade Celular.....	53

5.18 Ensaio de Proliferação Celular.....	53
5.19 Análise Estatística.....	54
6 RESULTADOS	55
6.1 Efeito do EHVB na dermatite de contato irritativa induzida por óleo de cróton.....	55
6.2 Efeito do EHVB na liberação de citocinas induzida por TPA.....	60
6.3 Efeito da administração oral do EHVB na dermatite de contato irritativa induzida por TPA.....	62
6.4 Efeito do EHVB na dermatite de contato irritativa induzida por fenol.....	64
6.5 Efeito do EHVB na inflamação cutânea induzida pela aplicação repetida óleo de cróton.....	65
6.6 Efeito direto do EHVB sobre queratinócitos epidérmicos.....	75
6.7 Avaliação do efeito do tipo glicocorticoide do EHVB.....	77
7 DISCUSSÃO.....	91
8 CONCLUSÃO.....	108
REFERÊNCIAS.....	109
ANEXOS	128

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Uso de plantas medicinais como estratégia terapêutica

Desde os primórdios da humanidade o homem tem encontrado na natureza recursos que auxiliam na manutenção do seu bem estar proporcionando a melhoria da qualidade de vida e a preservação da vida. Da natureza, seja na forma de plantas, animais, microrganismos ou minerais, são extraídas substâncias genericamente chamadas de produtos naturais, as quais têm sido desde muito tempo, amplamente utilizados para fins terapêuticos, no controle de distúrbios e na cura de doenças, assim como para fins recreativos ou religiosos (DE LUCA et al., 2012). Dentre os produtos naturais, aqueles derivados de plantas representam os principais remédios utilizados pelo homem há milhares de anos, tendo essa relação, permitido que as plantas formassem a base de muitos sistemas medicinais tradicionais espalhados pelo mundo todo. E ainda, atualmente, as plantas continuam sustentando diversos sistemas medicinais complementares, como a fitoterapia. (CRAGG; NEWMAN, 2013).

É importante destacar que as plantas podem, e são empregadas em diferentes estratégias terapêuticas, as quais vão desde infusões caseiras até a droga vegetal empregada como fonte de fármacos na indústria farmacêutica. Quando utilizadas *in natura*, seja na forma íntegra ou fracionada, em preparações caseiras, como chás e tinturas, as plantas são consideradas plantas medicinais e são extensivamente empregadas na medicina tradicional. Outra abordagem terapêutica é a utilização do extrato bruto ou de frações enriquecidas padronizadas em preparações farmacêuticas como cápsulas, tinturas, extratos fluidos ou secos, quando então, podem ser considerados medicamentos fitoterápicos (RATES, 2001). Os agentes fitoterápicos são constituídos de misturas complexas padronizadas, de uma ou mais plantas, onde nem sempre se conhece o princípio ativo (CALIXTO, J. B., 2000). Por fim, as plantas representam rica fonte de protótipos para novos fármacos. Através do fracionamento e purificação dos extratos vegetais é possível extrair e isolar compostos biologicamente ativos de grande interesse na indústria farmacêutica (RATES, 2001).

A espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) é um bom exemplo de espécie utilizada em diversos recursos terapêuticos, os quais demonstram eficácia satisfatória no tratamento de distúrbios gástricos como dispepsias e úlceras gástricas. O uso da espinheira santa tem início na medicina popular, onde as folhas frescas ou secas são empregadas no preparo de infusões as quais são administradas por via oral. Essa é a estratégia mais antiga e que perdura até a atualidade, onde a espécie é utilizada, portanto, *in natura* como uma planta medicinal (SOUZA-FORMIGONI et al., 1991). O uso tradicional bem sucedido incentivou o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos a partir da planta medicinal. Atualmente estão registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) mais de uma dezena de agentes fitoterápicos derivados das folhas de espinheira santa na forma de extrato seco ou tintura, sendo as concentrações das cápsulas ou tinturas padronizadas de acordo com a porcentagem de taninos presente na formulação (CARVALHO, A. C. B. et al., 2008). Além disso, *M. ilicifolia* também pode ser considerada uma potencial fonte de novos fármacos, uma vez que estudos fitoquímicos têm demonstrado o isolamento e identificação de diversos compostos com atividades biológicas conhecidas. Além dos taninos, foram ainda identificados flavonoides, alcaloides, macrolídeos e terpenóides, incluindo quatro triterpenos inéditos (SANTOS-OLIVEIRAI; COULAUD-CUNHAI; COLAÇO, 2009).

1.2 Medicamentos fitoterápicos

Nos últimos anos a popularidade dos agentes fitoterápicos tem crescido extensivamente, não apenas nos países em desenvolvimento onde o uso de plantas nos sistemas medicinais nunca saiu de cena, mas principalmente nos países desenvolvidos. Após a revolução industrial, a partir do século XIX, a obtenção de compostos sintéticos assim como a modificação de estruturas químicas tornou-se bastante facilitada. Assim, os produtos naturais foram perdendo seu valor, ficando seu uso restrito à população mais pobre, normalmente associado à importância religiosa e mística e visto como uma incapacidade social de usufruir das maravilhas trazidas pela modernidade (RATES, 2001).

Muitos são os fatores que alicerçam o atual interesse pelos medicamentos fitoterápicos em países industrializados. O ambientalismo, um conceito que vem ganhando cada vez mais destaque na sociedade moderna incentiva o uso de fitoterápicos como intervenções de saúde “mais naturais”. Além disso, o uso de fitoterápicos é impulsionado pela preferência populacional, baseada na crença popular de que tudo o que vem da natureza é bom e com menor capacidade de gerar efeitos adversos. Adicionalmente, o surgimento de novas doenças, para as quais não existem ainda tratamentos adequados, também estimula o uso de agentes fitoterápicos na tentativa de conter os sintomas não controlados (CAPASSO et al., 2000).

A fitoterapia é um dos sistemas de terapia complementar mais utilizado em todo o mundo, sendo os fitoterápicos considerados componentes essenciais na atenção primária à saúde. Os pacientes têm acesso a estes agentes através de prescrição médica, mas também por indicação de outros terapeutas “não médicos” e principalmente através da automedicação. O uso de medicamentos sem aconselhamento profissional é extremamente comum na fitoterapia, uma vez que os pacientes se sentem ligados às plantas pela tradição e acabam por escolher o procedimento terapêutico baseados nas experiências familiares (JOOS; GLASSEN; MUSSELMANN, 2012). São diversos os fitoterápicos aprovados e registrados no Brasil, os quais são utilizados para o tratamento das mais diversas doenças. O governo federal, reconhecendo a importância da fitoterapia na atenção primária à saúde, incluiu alguns agentes fitoterápicos na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), os quais passaram a ser disponibilizados através do Sistema Único de Saúde (SUS) (TABELA 1) (BRASIL, 2012b; OLIVEIRA et al., 2012).

TABELA 1 - MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS INCLUÍDOS NA RENAME.

NOME POPULAR	ESPÉCIE	INDICAÇÃO	APRESENTAÇÃO
Alcachofra	<i>Cynara scolymus</i> L.	Dispepsia funcional; hipercolesterolemia.	cápsula, comprimido, drágea, solução oral e tintura
Aroeira	<i>Schinus terebenthifolius</i> Radd	Cicatrizante; anti- inflamatória e anti-séptica	gel e óvulo
Babosa	<i>Aloe vera</i> (L.) Burm. f.	Queimaduras; psoríase vulgaris	Creme

continua

TABELA 1 - MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS INCLUÍDOS NA RENAME.

conclusão

NOME POPULAR	ESPÉCIE	INDICAÇÃO	APRESENTAÇÃO
Cáscara-sagrada	<i>Rhamnus purshiana</i> DC.	Obstipação intestinal	cápsula e tintura
Espinheira-santa	<i>Maytenus officinalis</i> Mabb.	Gastrite; úlcera gastroduodenal; dispepsia	cápsula, emulsão, solução oral e tintura
Guaco	<i>Mikania glomerata</i> Spreng.	Expectorante; broncodilatador	cápsula, solução oral, tintura e xarope
Garra-do-diabo	<i>Harpagophytum procumbens</i>	Dor lombar; osteoartrite.	cápsula, comprimido
Hortelã	<i>Mentha piperita</i> L.	Síndrome do cólon irritável; antiflatulento; antiespasmódico	cápsula
Isoflavona-de-soja	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	Sintomas do climatério	cápsula e comprimido
Plantago	<i>Plantago ovata</i> Forssk	Obstipação intestinal; síndrome do cólon irritável	pó para dispersão oral
Salgueiro	<i>Salix alba</i> L.	Dor lombar; anti-inflamatório	comprimido
Unha-de-gato	<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd. ex Roem. & Schult).	Artrite e osteoartrite; anti-inflamatório; imunomodulador	cápsula, comprimido e gel

Fonte: Ministério da Saúde, 2012.

Ainda seguindo o que preconiza a Organização Mundial da Saúde (OMS) no sentido de valorizar as práticas tradicionais regionais, o Ministério da Saúde tem publicado protocolos, cadernos e diretrizes no intuito de sensibilizar e orientar gestores e profissionais da saúde a formular e implantar projetos, programas e políticas que garantam o fortalecimento da fitoterapia especialmente na atenção básica à saúde. Uma dessas publicações, a “Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica” incentiva a prescrição fitoterápica responsável, sendo que segundo esse caderno, uma maneira de aperfeiçoar a escolha do fitoterápico seria classifica-lo em categorias terapêuticas, o que orienta e facilita a decisão clínica (TABELA 2) (BRASIL, 2012a).

TABELA 2 – CATEGORIAS TERAPÊUTICAS PARA FITOTERÁPICOS.

Categoria 1	Indicações para as quais os fitoterápicos são a opção terapêutica de 1ª escolha e, para as quais, como alternativa, não existiriam medicamentos sintéticos*. Exs.: hepatites tóxicas, hiperplasia benigna de próstata, entre outros.	continua
--------------------	--	----------

TABELA 2 – CATEGORIAS TERAPÊUTICAS PARA FITOTERÁPICOS.

conclusão

Categoria 2	Indicações para as quais os medicamentos sintéticos podem ser substituídos por fitoterápicos. Exs.: estados leves de ansiedade e/ou depressão reativa, dispepsia não ulcerosa neoplásica, infecções urinárias inespecíficas, entre outros.
Categoria 3	Indicações nas quais os fitoterápicos podem ser usados como coadjuvantes para uma terapia básica. Exs.: outras doenças hepáticas e das vias respiratórias, entre outras.
Categoria 4	Indicações nas quais o uso dos fitoterápicos não é adequado, caracterizando até mesmo erro médico, pela possibilidade de retardar ou impedir uma terapia racional com medicamentos sintéticos, mais adequados. Ex.: tratamento primário do câncer.

Fonte: Ministério da Saúde, 2012.

São os metabólitos naturalmente produzidos como mecanismo de adaptação, que conferem às plantas as propriedades terapêuticas exploradas pelo homem na utilização de fitoterápicos. Como resultado de suas interações com o meio ambiente, as plantas produzem uma série de substâncias que as auxiliam em sua manutenção e sobrevivência. Esses compostos químicos são dotados de uma complexidade estrutural única que lhes confere atividades biológicas e mecanismos de ação extremamente complexos e dificilmente alcançados através da síntese química pura (GOTTLIEB, 1990; MISHRA; TIWARI, 2011). Como instrumento de defesa contra herbívoros e microrganismos, as plantas sintetizam uma mistura complexa de componentes os quais atingem diversos alvos celulares, podendo interagir com sítios ativos de receptores, alterar estruturas proteicas, interferir na síntese de DNA e alterar a permeabilidade de membranas. São esses efeitos moleculares que justificam os efeitos biológicos observados quando agentes fitoterápicos são empregados para fins terapêuticos (WINK, 2008).

Atualmente são conhecidos mais de 100.000 metabólitos, entre os quais se destacam compostos fenólicos, terpenos, saponinas, taninos, glicosídeos e alcaloides que demonstram atividade antibacteriana, antiproliferativa, antioxidante, anti-inflamatória e estimulante do sistema nervoso central, atividades essas que justificam a aplicação terapêutica de extratos botânicos no tratamento das mais variadas doenças em diversos sistemas medicinais (WINK, 2008). Muitos desses fitocompostos servem como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos, entretanto essa visão reducionista que elege apenas um ou poucos compostos como responsáveis pelos efeitos terapêuticos da planta, tem perdido espaço para uma abordagem mais holística. Um dos motivos para essa mudança de foco é a

ausência de eficácia de alguns fármacos principalmente no tratamento de doenças crônicas, onde normalmente o distúrbio não atinge apenas um alvo molecular, mas sim apresenta um mecanismo patogênico multifatorial (EFFERTH; KOCH, 2011).

Muitas plantas demonstram atividade farmacológica promovida não pelo efeito de apenas um metabólito, mas pela combinação de efeitos de diversas substâncias com resultado de interações aditivas ou sinérgicas do tipo farmacodinâmica, farmacocinética ou química. Nesses casos, o isolamento de um único princípio ativo poderia levar à exclusão de efeitos farmacológicos importantes (RATES, 2001). Diversos agentes fitoterápicos demonstram que efeitos são alicerçados na ação combinada da mistura de seus componentes, os quais muitas vezes, quando isolados, não conservam eficácia comparável. A erva-de-são-joão (*Hypericum perforatum*), por exemplo, é um antidepressivo extensivamente utilizado na fitoterapia que tem seus efeitos baseados na interação de seus compostos. De acordo com estudos pré-clínicos, a administração da rutina, um biflavonóide isolado do extrato de *H. perforatum*, ou da fração metanólica de *H. perforatum* (pobre em rutina), não promove efeito antidepressivo. Entretanto, quando administradas a fração metanólica enriquecida com rutina, ou o extrato etanólico rico em rutina, o efeito antidepressivo é bastante expressivo (NOLDNER; SCHOTZ, 2002). Assim também ocorre com o *Ginkgo biloba*, um fitoterápico amplamente empregado no tratamento de distúrbios circulatórios, do qual o extrato padronizado das folhas, rico em flavonoides e terpenos, apresenta diversos efeitos farmacológicos comprovadamente resultantes da complementariedade dos efeitos sinérgicos ou antagônicos de seus constituintes (MAHADEVAN; PARK, 2008).

1.3 Limitações da fitoterapia: qualidade, eficácia e segurança.

Os fitoterápicos contribuem de maneira bastante expressiva para o mercado farmacêutico mundial, movimentando cerca de U\$ 80 bilhões por ano, e estando ainda em processo de ascensão, especialmente nos países desenvolvidos (ZHANG et al., 2012). Entretanto, apesar da atratividade dessa abordagem terapêutica, não se pode negligenciar as limitações que prejudicam a utilização de medicamentos derivados de espécies vegetais. Os principais problemas observados estão

relacionados com a ausência de fiscalização eficiente sobre a qualidade das preparações farmacêuticas, assim como, com a ausência de dados científicos acerca da eficácia e segurança desses agentes. Alguns fatores exclusivos dos medicamentos fitoterápicos, como o desconhecimento do princípio ativo, a dificuldade em garantir a estabilidade, a padronização e a qualidade das preparações e da matéria-prima, acabam dificultando ainda mais a evolução da fitoterapia (CALIXTO, J. B., 2000).

A padronização de um medicamento fitoterápico é essencial para seu aproveitamento de maneira correta e produtiva, e envolve um controle de qualidade rigoroso que vai desde o cultivo da planta até a administração do produto final. São falhas no controle de qualidade que normalmente levam à diminuição da eficácia ou ao aparecimento de efeitos adversos que acabam por prejudicar o uso de agentes fitoterápicos (GARG et al., 2012). Uma das maiores dificuldades em garantir a qualidade desses medicamentos é a falta de diretrizes claramente estabelecidas pelos órgãos reguladores acerca da produção de fitoterápicos. Em alguns países a legislação que regula o uso de fitoterápicos é a mesma que rege a utilização de suplementos nutricionais, enquanto que em outros, as normas seguidas são as mesmas para medicamentos. Assim, o processo de regulação legal e a legislação que rege os agentes fitoterápicos são ainda um tanto confusas (CALIXTO, J. B., 2000). No Brasil o registro de medicamentos fitoterápicos segue um regulamento técnico estabelecido pela resolução RDC 48/2004 da ANVISA, que regulamenta a produção desses medicamentos exigindo comprovação da qualidade, eficácia e segurança através de relatórios técnicos (ANVISA, 2004).

O longo processo que vai desde o cultivo da planta medicinal até a disponibilização do produto acabado, é cercado de diversos fatores que, quando não são controlados adequadamente, podem interferir com a qualidade do medicamento. As condições de cultivo da planta devem seguir padrões rígidos de qualidade que impeçam o surgimento de contaminações as quais, quando presentes, podem desqualificar o material vegetal. Os principais tipos de contaminação ocorrem por pesticidas, metais pesados, microrganismos e micotoxinas. Outra grande preocupação é a adulteração da droga vegetal pela adição de ingredientes estranhos, inapropriados ou inferiores que também pode causar prejuízo da qualidade do medicamento fitoterápico. As adulterações mais comuns incluem a substituição do material vegetal por outras partes da planta, que não a de interesse,

além da adição de compostos sintéticos ou de materiais estranhos como areia e metais. Além disso, a identificação correta da espécie de interesse é essencial para garantir a qualidade do produto. Algumas plantas podem ser confundidas e identificadas incorretamente, principalmente pela similaridade fenotípica de algumas espécies, pela falta de marcadores específicos para cada planta e ainda por confusões de nomenclatura que podem ocorrer, principalmente quando relacionadas a hábitos tradicionais de uso de plantas medicinais regionais (ZHANG et al., 2012).

Além dos fatores extrínsecos acima citados, a qualidade dos medicamentos fitoterápicos pode também ser afetada por fatores intrínsecos às plantas. Ao contrário dos medicamentos sintéticos os quais possuem um único composto, os fitoterápicos possuem uma composição química riquíssima o que os caracterizam como produtos complexos. Como já citado, os efeitos farmacológicos dessas formas extrativas são alcançados através da interação dos efeitos de diversos compostos presentes na planta. Assim, para a garantia de sempre se obter a mesma eficácia e segurança, é necessário que se mantenha a mesma composição química da preparação farmacêutica. Entretanto, o controle desse parâmetro torna-se dificultoso uma vez que são processos metabólicos que determinam a produção de metabólitos durante o desenvolvimento da planta. Dessa maneira, muitos fatores podem alterar o perfil qualitativo e quantitativo da composição química da planta, entre eles destacam-se: as características geográficas de cultivo, como o clima, o tipo de solo, e a exposição solar; a parte da planta coletada; as condições da coleta, como o estado de maturação da planta, a estação do ano, ou o período do dia. Além disso, as condições de armazenamento, processamento e os procedimentos de extração também podem alterar a composição química da droga vegetal (SHAW et al., 2012).

Outro grande problema se concentra na falta de comprovação científica da eficácia e segurança dos fitoterápicos. A grande maioria dos medicamentos fitoterápicos é desenvolvida com base na eficácia demonstrada por relatos etnobotânicos. São raros os estudos clínicos que comprovem a eficácia e segurança desses medicamentos, e os que existem tem validade duvidosa uma vez que há uma grande variabilidade em relação à dosagem e ao tempo de tratamento, não há padronização da preparação farmacêutica, os estudos não são randomizados e não possuem número de pacientes suficientes. Além do mais, o estabelecimento de um grupo placebo é dúvida, principalmente pela dificuldade em mascarar as características organolépticas dos fitoterápicos (CALIXTO, J. B., 2000).

Tão importante quanto a comprovação da eficácia é a certificação da segurança do produto vegetal. Muitas vezes uma planta medicinal que é amplamente utilizada durante anos através do conhecimento tradicional, demonstra toxicidade quando avaliada para o desenvolvimento de um medicamento padronizado. Nesses casos, a produção do fitoterápico pode ser inviável, ou algumas vezes, é necessária a padronização do uso limitado a uma determinada via de administração através da qual o efeito tóxico não seja importante (JORDAN; CUNNINGHAM; MARLES, 2010). O confrei (*Symphytum officinale*), por exemplo, é uma planta medicinal com longo histórico na medicina popular onde é administrado das mais variadas formas para o tratamento de diversas doenças. Apesar da admirável eficácia, especialmente no alívio de sinais e sintomas inflamatórios, estudos recentes demonstraram a presença de alcaloides extremamente tóxicos quando administrados por via oral, fato que promoveu a restrição ao uso interno do fitoterápico (HORINOCHI, C. D. S.; OTUKI, 2013).

1.4 Otimização do manejo de fitoterápicos no contexto da cadeia produtiva

Atualmente, existe um grande apelo para a inserção de análises da cadeia produtiva para a otimização das questões socioeconômicas que envolvem o desenvolvimento de um produto. Cadeia produtiva é conceituada como a sequência de atividades necessárias para a obtenção de um produto final desde a sua matéria-prima, as quais podem ser influenciadas por fatores políticos, econômicos e financeiros, tecnológicos, socioculturais e legais. Apesar de a cadeia produtiva ser ainda pouco considerada na produção de fitoterápicos, muitos dos desafios enfrentados na prática da fitoterapia racional, poderiam ser minimizados ou solucionados com a observação cuidadosa de alguns segmentos da cadeia (BOOKER; JOHNSTON; HEINRICH, 2012).

No cenário atual onde cada vez mais se torna necessário a consideração de parâmetros ecológicos, alguns pontos devem ser cautelosamente analisados anteriormente ao desfrute das dádivas da natureza. Atualmente, existe uma importante preocupação acerca da sustentabilidade dos recursos naturais, dos quais é sabido não serem inesgotáveis (CORDELL; COLVARD, 2012). Aproximadamente

dois terços das plantas medicinais utilizadas mundialmente são coletados da natureza, ao passo que apenas 10% dos fitoterápicos são provenientes de espécies cultivadas (CANTER; THOMAS; ERNST, 2005). Assim, parece ser urgente a necessidade de inserção do conceito de sustentabilidade no desenvolvimento de fitoterápicos. É inaceitável, por exemplo, utilizar uma planta em extinção para extração de princípios ativos, por outro lado, espécies endêmicas e de fácil cultivo devem ser alvos prioritários na seleção de espécies precursoras de medicamentos (CORDELL, 2011). O cultivo racional da planta medicinal traz ainda muitas outras vantagens, como o favorecimento do controle de fatores que levam à solução de vários problemas de qualidade e segurança do fitoterápico (TABELA 3) (CAPASSO et al., 2000).

TABELA 3 - PLANTAS MEDICINAIS SELVAGENS E CULTIVADAS: VANTAGENS E DESVANTAGENS

FATOR CONSIDERADO	PLANTA	
	Selvagem	Cultivada
Disponibilidade	Decrescente	Crescente
Manipulação agrônômica	Não	Sim
Adulteração	Provável	Relativamente seguro
Identificação botânica	Nem sempre confiável	Inquestionável
Flutuação no fornecimento	Instável	Constante
Melhoramento genético	Não	Sim
Controle de qualidade	Precário	Alto
Manejo pós-coleta	Precário	Normalmente bom

Fonte: Capasso et al., 2000.

As espécies utilizadas em reflorestamentos representam fontes atrativas para o desenvolvimento de fitoterápicos, uma vez que são de fácil cultivo. O cultivo dessas espécies em amplas áreas com a coleta sustentável da matéria-prima representa uma estratégia promissora que aproxima os fitoterápicos dos moldes ideais de produção. Como exemplo bem sucedido podemos citar as árvores chinesas do gênero *Aquilaria* sp. das quais é extraída uma resina aromática de alto valor comercial. O uso da resina na fabricação de incenso durante séculos colocou as aquilárias no caminho da extinção, entretanto, diversos projetos foram desenvolvidos para incentivar o reflorestamento de grandes áreas com essas espécies e promover a coleta sustentável da resina. Essas iniciativas permitem a

manutenção do fornecimento da resina sem prejudicar as árvores selvagens (LIU et al., 2013).

Quando exploradas de maneira responsável, as plantas guardam em si um indiscutível e rentável potencial medicinal. Contando com uma biodiversidade invejável, o Brasil deveria ter papel de destaque na produção mundial de fitoterápicos, entretanto a balança comercial brasileira apresenta um déficit considerável, uma vez que embora extratos de plantas como alcaçuz, bardana, catuaba e quina somam cerca de U\$ 7 milhões em exportação, uma quantidade considerável de hormônios esteroidais e outros produtos naturais são massivamente importados. Esse contrassenso é sustentado pela falta de informações acerca do potencial terapêutico de plantas nativas, uma vez que a grande maioria dos fitoterápicos utilizados no país é derivada de espécies introduzidas (PINTO et al., 2002). Assim, as plantas brasileiras constituem um fascinante e promissor campo de pesquisa acadêmica e de desenvolvimento esperando para ser desvendado.

Em busca de alternativas sustentáveis para o desenvolvimento de novos fitoterápicos derivados da flora brasileira, nosso grupo de pesquisa avaliou a possível atividade anti-inflamatória de três espécies com potencial para utilização em reflorestamento, dentre as quais, *Vochysia bifalcata* revelou um alto potencial.

1.5 *Vochysia bifalcata* Warm. – uma espécie promissora

Vochysia bifalcata Warm. (Vochysiaceae) é uma árvore brasileira nativa, popularmente conhecida como guaricica, pau-amarelo, pau-de-vinho ou vinheiro (CARVALHO, P. E. R., 2008). A família Vochysiaceae possui oito gêneros os quais somam aproximadamente 200 espécies, quase que totalmente exclusivas das Américas do Sul e Central. O gênero *Vochysia* conta com cerca de 100 espécies, as quais se concentram principalmente em regiões de floresta tropical, subtropical e savanas. No Brasil, são encontradas aproximadamente 80 espécies de *Vochysia* distribuídas entre as regiões Guiano-Amazônica, Planalto Central e Mata Atlântica (VIANNA, 2006). Três espécies de *Vochysia* são encontradas no Paraná, *V. bifalcata* Warm, *V. magnifica* Warm. e *V. tucanorum* Mart. Essas espécies povoam florestas ombrófilas densas sendo frequentemente encontradas nas encostas de

morros principalmente dos municípios de Antonina, Guaraqueçaba, Morretes e Paranaguá (NEGRELLE; MOROKAWA; RIBAS, 2007).

Vochysia bifalcata é uma espécie arbórea que alcança até 25 m de altura na idade adulta. Apresenta copa densa perenefólia, possui flores amarelas vistosas que florescem de dezembro a março e os frutos são tipo cápsula lenhosa de coloração marrom e possuem sementes aladas (Figura 1) (RICKLI, 2012). As folhas são verticiladas com três folhas por verticilo, verde-amareladas e brilhantes e medem de 8 a 15 cm de comprimento. O pecíolo é glabro, caniculado e mede de 0,5 a 1,5 cm de comprimento. É uma espécie secundária inicial que durante a regeneração natural apresenta crescimento rápido em altura e diâmetro, sendo, portanto, de extrema importância para o estabelecimento de florestas secundárias onde forma agrupamentos densos na fase de capoeira e se mantém dominante até a fase de capoeirão (CARVALHO, P. E. R., 2008). Por essa característica de espécie dominante e de crescimento rápido, *V. bifalcata* tem sido empregada no reflorestamento para recuperação de áreas degradadas. Tendo em vista a demanda por mudas nativas para a regeneração de áreas desmatadas, *V. bifalcata* torna-se uma espécie importante para os programas de reflorestamento. Entretanto, por ser uma espécie de difícil cultivo em viveiros, diversos estudos tem sido conduzidos em busca do melhoramento das formas de propagação para otimização da inserção da espécie nos programas de reflorestamento (DANNER et al., 2010; RICKLI, 2012). Considerada ainda como uma espécie ornamental, devido suas admiráveis flores amarelas, *V. bifalcata* é indicada para a composição vegetal de parques. Em Curitiba, a Prefeitura Municipal inseriu a espécie na arborização urbana (CARVALHO, P. E. R., 2008).



Figura 1. Guaricica (*V. bifalcata* Warm.)

Fonte: Embrapa Florestas, 2008.

Além da importância ecológica, *V. bifalcata* tem um papel marcante na vida social e econômica dos nativos da planície litorânea e Serra do Mar, onde a madeira e a seiva da árvore são empregadas para os mais diversos fins. A madeira branca é bastante apreciada nas serrarias locais para a fabricação de laminados e tábuas, e na confecção de caixotes, embalagens leves e brinquedos. A espécie tem ainda potencial para a extração de celulose, e proporciona lenha de boa qualidade, podendo ser utilizada no fornecimento de energia (CARVALHO, P. E. R., 2008). Do tronco da *V. bifalcata* escorre uma resina natural semelhante à goma arábica, que pode ser utilizada como uma substância adesiva na aglutinação de formas farmacêuticas. Essa mesma seiva, é bastante apreciada como uma bebida *in natura* consumida pelos nativos, os quais a denominam vinho-de-guaricica (CARVALHO, P. E. R., 2008; MAYWORM et al., 2011).

Apesar da relevância econômica e ambiental da espécie, afora a utilização da madeira e seiva, outras partes da planta são pouco exploradas e ainda desperdiçadas. Assim, a utilização de partes alternativas da planta, como as folhas, poderia melhorar o gerenciamento e os benefícios da aplicação econômica dessa

espécie. Nesse sentido, considerar uma possível atividade biológica das folhas de *V. bifalcata* parece ser uma perspectiva promissora para nova utilização e aproveitamento da planta ampliando os benefícios socioeconômicos da cadeia produtiva da espécie. Embora não hajam relatos relacionados a essa espécie, diversas outras espécies do gênero *Vochysia* são utilizadas por comunidades tradicionais na América do Sul para aliviar os sintomas de doenças inflamatórias, entre as quais se destacam lesões cutâneas, doenças respiratórias como asma e congestão pulmonar e ainda distúrbios do trato gastrointestinal (GOMES RDE et al., 2009; WENIGER et al., 2005).

Relatos da literatura tem sustentado o uso popular e ainda, comprovado atividades biológicas e farmacológicas das espécies de *Vochysia*, enquanto a caracterização fitoquímica dessas espécies tem atribuído as atividades biológicas verificadas aos metabólitos secundários identificados, entre os quais se destacam triterpenos, esteroides e polifenóis como flavonoides e derivados do ácido elágico (NETO et al., 2011).

TABELA 4 – ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Vochysia*.

Produto	Efeito	Modelo	Referência
<i>V. divergens</i>			
Ext. cascas β-sitosterol Ácido betulínico Ácido séríco	Antibacteriano	<i>Staphylococcus aureus</i>	Hess et al., 1995
Ácido tormêntico	Antinociceptivo	CFA; ligadura nervo ciático	Bortalanza et al., 2002
<i>V. tucanorum</i>			
Ext. folhas	Antiulcerogênico Antioxidante	HCl/etanol; etanol; piroxicam	Gomes R et al., 2009
<i>V. pacífica</i>			
Ext. cascas	Anti-inflamatório	Atividade PDE4	Weninger et al., 2005

Fonte: o autor, 2013.

De acordo com o trabalho de Hess e colaboradores (1995), *Vochysia divergens* uma espécie do Pantanal Matogrossense a qual é popularmente utilizada para o tratamento de infecções e asma, contém entre seus princípios ativos β-

sitosterol, ácido betulínico e ácido serícico. Nesse trabalho tanto o extrato bruto quanto os compostos isolados das cascas do caule da espécie demonstraram atividade antibacteriana quando testados sobre culturas de *Staphylococcus aureus* (HESS et al., 1995). O ácido tormêntico é outro triterpeno isolado das cascas de *V. divergens* o qual demonstrou atividade antinociceptiva quando administrado por via oral em modelos de dor neuropática e inflamatória em camundongos (BORTALANZA et al., 2002). *V. tucanorum*, espécie também encontrada no Paraná, é considerada importante planta medicinal utilizada no Cerrado brasileiro contra distúrbios gástricos. O extrato metanólico das folhas de *V. tucanorum* demonstrou atividade antiulcerogênica promovendo atividade antioxidante e protetora gástrica (GOMES RDE et al., 2009). Das cascas de *V. pacifica*, uma espécie endêmica da Colômbia, foram isolados sete triterpenos entre os quais, o ácido betulínico, ácido serícico e quadranoside I, os quais demonstraram potencial atividade anti-inflamatória ao inibir a atividade da enzima fosfodiesterase 4 (WENIGER et al., 2005). A análise das informações fitoquímicas e biológicas de espécies do gênero *Vochysia* demonstra alta probabilidade de que *V. bifalcata* contenha metabólitos ativos que lhes confira efeitos biológicos interessantes.

1.6 Inflamação cutânea como ferramenta de estudo

Atualmente existe uma busca incansável por novas estratégias terapêuticas para diversas doenças e distúrbios da saúde incluindo doenças inflamatórias crônicas cutâneas. A procura por uma farmacoterapia ideal almeja o equilíbrio entre eficácia, segurança e custo de um medicamento. Entretanto, usualmente nos deparamos com problemas de saúde para os quais esses três pilares da farmacoterapia encontram-se extremamente desequilibrados. Existem doenças, por exemplo, para as quais as terapias farmacológicas disponíveis carecem de eficácia, como a esclerose múltipla (SOLARO; TRABUCCO; MESSMER UCCELLI, 2013). Para outras, os tratamentos apresentam eficácia moderada, entretanto a segurança é baixa, a ponto muitas vezes, do paciente necessitar abandonar o tratamento, como ocorre com o uso de imunossupressores na artrite reumatoide (SAAG, 2012). Ainda, algumas terapias são altamente eficazes, entretanto o custo exorbitante inviabiliza o

acesso ao tratamento, como observado com os agentes biológicos no tratamento de diversas doenças inflamatórias crônicas como a espondilite anquilosante e a psoríase (FERRANDIZ; CARRASCOSA; BOADA, 2010; REVEILLE; XIMENES; WARD, 2012).

A psoríase é uma das doenças dermatológicas que expõe diversos dos impasses terapêuticos descritos acima, os quais variam de acordo com o grau de severidade. Dessa forma, são grandes os esforços em busca de novas estratégias terapêuticas, sendo que atualmente a consideração da fitoterapia como componente do esquema terapêutico da psoríase tem recebido destaque. De forma que alguns extratos como o indigo naturalis, um pó extraído da espécie *Baphicacanthus cusia*, tem demonstrado eficácia e segurança apreciáveis em reduzir lesões psoriáticas quando aplicados por via tópica em estudos clínicos. Sendo que, essas propriedades sustentaram a inserção desse extrato no arsenal terapêutico da psoríase em diversos países (REUTER; MERFORT; SCHEMPP, 2010).

O modelo de edema de orelha representa uma ferramenta eficaz e prática na identificação de possível atividade biológica de novas substâncias. Trata-se de um modelo de inflamação cutânea que pode ser utilizado para a avaliação de substâncias isoladas ou extratos de plantas aplicados tanto por via tópica quanto por vias sistêmicas. Os modelos de inflamação cutânea demonstram algumas vantagens frente a outros modelos, como a rápida obtenção de resultados e fácil reprodutibilidade, a simplicidade do método e a necessidade de apenas uma pequena quantidade da substância ou da forma extrativa a ser testada (GABOR, 2003).

A pele é o órgão responsável pela proteção primária do organismo, contra estímulos provenientes do meio ambiente. Uma vez que recobre toda a superfície corporal, a pele forma uma barreira protetora que impede que agressores externos interfiram com a homeostasia do organismo. A proteção do organismo interno é, portanto a principal função da pele, e essa proteção não é exercida apenas pela formação de uma barreira física, uma vez que a pele é considerada também um importante componente do sistema imune. Estando este órgão complexo organizado de maneira que seus componentes são capazes de desencadear uma resposta imune primária uma vez que haja um estímulo, como a presença de um patógeno ou a exposição a um agente irritante (DEBENEDICTIS et al., 2001; MAKRANTONAKI; ZOUBOULIS, 2007; SPELLBERG, 2000).

As células cutâneas organizam-se com os demais componentes da pele de maneira a formar as três grandes camadas que definem a estrutura deste órgão complexo (Figura 2). Essas camadas são: a epiderme - camada externa, a derme – camada intermediária e a hipoderme – camada profunda, as quais desempenham papel fundamental na função protetora da pele. Uma vez que está mais exposta, a epiderme é a responsável pela proteção contra traumas mecânicos, contra a perda de água, e contra a entrada de patógenos provenientes do meio ambiente, como bactérias e toxinas (DENNING, 2004; MAKRANTONAKI; ZOUBOULIS, 2007).

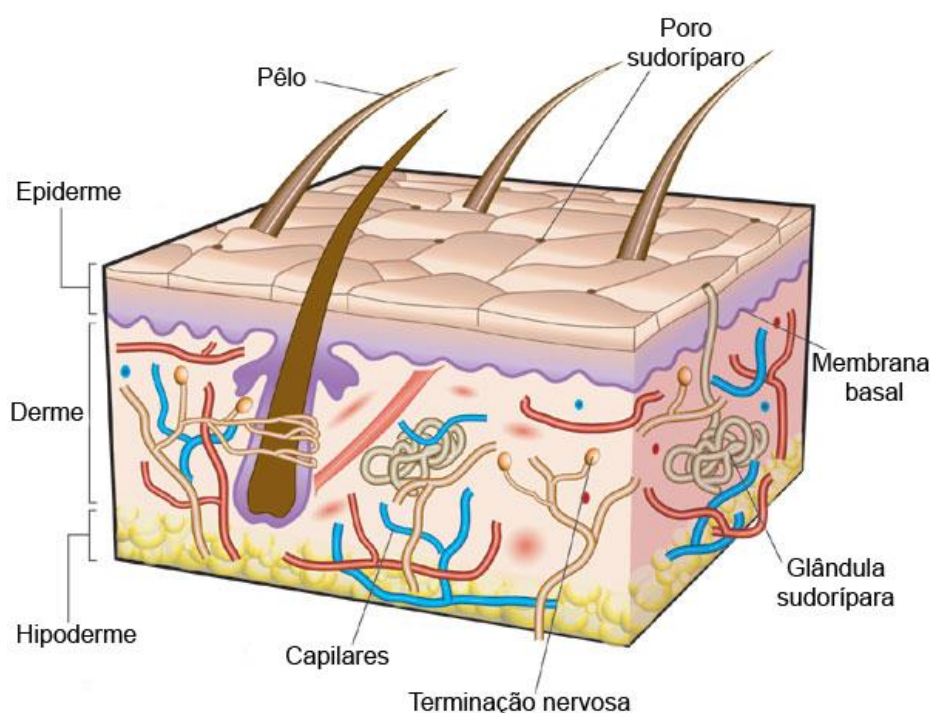


Figura 2. Estrutura da pele humana.

Fonte: Adaptado de (MACNEIL, 2007).

Os queratinócitos são as principais células encontradas na epiderme, e organizam-se em um epitélio estratificado pavimentoso constituído de cinco camadas: camada basal, camada espinhosa, camada granulosa, camada lúcida e camada córnea. Cada uma dessas camadas é constituída de células que se encontram em diferentes níveis de diferenciação e com distintas taxas de proliferação, sendo que a camada basal apresenta alta taxa proliferativa. Uma vez formadas na camada basal, essas células migram para as demais camadas em direção à superfície, e ao passo que transpõe as camadas vão se diferenciando. A camada córnea é, portanto, marcada por células totalmente diferenciadas,

anucleadas e descamativas. Assim, a epiderme encontra-se em constante renovação o que a caracteriza como uma camada bastante dinâmica (GNIADECKI, 1998).

Embora a epiderme seja constituída basicamente por queratinócitos, mesmo em menor número, outras células estão presentes nessa camada como, os melanócitos que são as células responsáveis pela produção de pigmentos, e as células de Langerhans que são células apresentadoras de antígenos (DENNING, 2004). Próximo a essas células encontram-se também alguns linfócitos T, que são geralmente células de memória (SPELLBERG, 2000). Apesar de não possuir vasos sanguíneos, a epiderme está intimamente acomodada sobre a derme com a qual se conecta através de uma lâmina basal, sendo, assim, a derme a responsável pelo suporte sanguíneo e entrega de nutrientes para a epiderme.

Uma das funções então da camada intermediária é prover o suporte de nutrientes para a epiderme e realizar a termorregulação, além disso, os componentes dessa camada têm papel fundamental em prover o ambiente ideal para o desenvolvimento e manutenção de processos inflamatórios quando necessário (MAKRANTONAKI; ZOUBOULIS, 2007). A derme também se divide em camadas, mas apenas em duas: uma camada mais superficial e frouxa, chamada camada papilar e uma camada mais profunda e mais densa, chamada reticular. A principal diferença dessas camadas é a composição e organização da matriz extracelular. Na derme papilar as fibras de colágeno são pouco organizadas e finas, e consistem principalmente de colágeno dos tipos III, existem ainda fibras elásticas que junto às fibras de colágeno se organizam de forma bastante frouxa. Ao contrário, na derme reticular a matriz é mais densa, com fibras mais grossas e melhor organizadas, sendo encontradas principalmente fibras de colágeno do tipo I, e fibras elásticas mais espessas que se agrupam com o colágeno em redes firmemente entrelaçadas (SORRELL; CAPLAN, 2004). Os fibroblastos são as principais e mais abundantes células da derme, as quais são as responsáveis pela síntese dos componentes da matriz extracelular como colágeno, elastina, glicosaminoglicanas, proteoglicanas, fibronectina e todas as proteínas responsáveis pela estrutura, resistência e elasticidade da pele. Na derme encontram-se ainda células inflamatórias residentes como mastócitos, linfócitos e macrófagos, que atuam como sentinelas com capacidade de desencadear uma resposta de defesa rápida frente a qualquer estímulo nocivo (MAKRANTONAKI; ZOUBOULIS, 2007).

Diversos são os estímulos que podem causar algum dano à barreira e desencadear a ativação de respostas de defesa. A pele é constantemente estimulada por agentes biológicos, químicos, mecânicos e físicos do meio ambiente. Uma vez que a estrutura física da pele não é suficiente para conter o agente agressor e há prejuízo da barreira, imediatamente uma cascata de eventos, envolvendo células e componentes cutâneos, é iniciada com intuito de reparar a lesão tecidual e reestabelecer a homeostasia da pele. Essa cascata de eventos é na verdade uma resposta inflamatória com ativação dos componentes imunes cutâneos que atuam contra os possíveis agentes agressores (FREINKEL; WOODLEY, 2001).

Como já citado, a pele representa um grande componente do sistema imune que atua como órgão sentinela capaz de desencadear resposta imune sistêmica quando necessário. Para tanto, esse componente imune periférico é composto principalmente de células de Langerhans e células apresentadoras de antígeno (APC) dérmicas, que circulam entre a pele e linfonodos; queratinócitos e células endoteliais, os quais produzem uma grande quantidade de citocinas regulatórias do sistema imune e fatores de crescimento; e linfócitos, que são infiltrados da circulação para a pele. Todos esses componentes atuam em conjunto para aperfeiçoar a detecção de antígenos ambientais e contê-los (DEBENEDICTIS et al., 2001). Entretanto, a resposta inflamatória na pele não ocorre apenas pela ativação do sistema imune cutâneo, mas sim pela ativação de diversos tipos celulares residentes, incluindo mastócitos, eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares. Essas células liberam mediadores quando ativadas por estímulos físico, químico, microbiológico ou imunológico, e esses mediadores provocam reações como aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, dor, coceira e recrutamento de células inflamatórias para o local (GREAVES, 2000).

As células estruturais da pele (queratinócitos e fibroblastos) também participam ativamente da resposta inflamatória. Além da indispensável atuação na reconstituição do tecido os queratinócitos são de extrema importância na síntese de mediadores que irão participar da modulação de todo o processo de reparação. Os queratinócitos da camada basal, uma vez estimulados, passam a expressar proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1, contribuindo significativamente para a rede inflamatória. O MCP-1 atrai macrófagos para o local os quais são essenciais para a reparação da pele normal, pois além de serem fagócitos e APC, os macrófagos são importantes fontes de fatores de crescimento (GILLITZER; GOEBELER, 2001). Os

queratinócitos liberam ainda citocinas e fatores de crescimento como fator de crescimento transformante (TGF)- α e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (WERNER; KRIEG; SMOLA, 2007).

Por serem células responsáveis e essenciais para a manutenção da estrutura cutânea, durante muito tempo, os fibroblastos não foram considerados células importantes para o sistema imune, entretanto, estudos têm demonstrado um importante *crosstalk* de citocinas entre fibroblastos e queratinócitos que contribui para a homeostasia do sistema imune na pele. Embora os queratinócitos também produzam citocinas secundárias, os fibroblastos liberam quantidades muito maiores dessas citocinas, estimulados por citocinas primárias liberadas pelos próprios queratinócitos. Os fibroblastos são também os principais fornecedores de fatores de crescimento necessários para a manutenção de queratinócitos e leucócitos, e essa liberação é aumentada na presença de estímulos inflamatórios. Além disso, a maior parte do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) que é formado na pele após exposição à irradiação ultravioleta do tipo B é sintetizado pelos fibroblastos (SPELLBERG, 2000; WILLIAMS; KUPPER, 1996).

Os fibroblastos parecem ser importantes células efetoras da resposta inflamatória, pois liberam fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), fator estimulante de colônia de granulócito (G-CSF), fator inibitório de leucemia (LIF), interleucina (IL)-1, IL-6 e IL-8 quando estimulados por IL-1 ou TNF. Ainda, estudos mostram que fatores de crescimento e citocinas liberados pelos fibroblastos dão suporte para o crescimento, diferenciação e ativação de células inflamatórias como os linfócitos T. Portanto, frente a um estímulo de patógeno, ou citocinas inflamatórias, os fibroblastos são capazes de produzir citocinas secundárias que atuam na amplificação e regulação da resposta inflamatória (GILLITZER; GOEBELER, 2001; PANG et al., 1994).

O sistema imune normalmente atua de maneira harmoniosa promovendo eventos inflamatórios que irão garantir a homeostasia tecidual. Entretanto, para que a normalidade do tecido seja restabelecida, os sinais pró-inflamatórios gerados pela resposta imune, precisam ser contidos por mecanismos de resolução, os quais sinalizam para o término do processo inflamatório. Se por algum motivo ocorrem falhas nos mecanismos de resolução, ou ainda se o contrário ocorre, onde a resposta do sistema imune se torna deficitária, podem surgir distúrbios inflamatórios cutâneos. Assim, se a resposta imune é insuficiente a pele fica susceptível a

infecções e desenvolvimento de tumores, por outro lado se a resposta imune é excessiva, além de possíveis doenças inflamatórias crônicas podem ocorrer doenças autoimunes (BUCKLE; HEDGECOCK, 1997; NESTLE et al., 2009; WILLIAMS; KUPPER, 1996).

Existem várias doenças inflamatórias crônicas de pele, e apesar de cada uma exibir suas peculiaridades quanto a componentes cutâneos afetados e sintomas desenvolvidos, geralmente todas elas envolvem interrupção da barreira com consequente perda da função de proteção, processo inflamatório constante e alterações no padrão de proliferação e diferenciação das células cutâneas. A maioria dessas doenças ainda não possuem mecanismos totalmente elucidados, entretanto sabe-se que tanto estímulos endógenos como mutações gênicas, quanto estímulos exógenos como a exposição a agentes irritantes são capazes de desencadear desordens inflamatórias crônica na pele (PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008).

Quando se fala em doença de pele crônica, uma das primeiras desordens abordadas é a psoríase, a qual apresenta grande incidência, afetando aproximadamente 2% da população em geral promovendo um alto impacto na qualidade de vida do paciente por afetar não somente a pele, mas também o componente psicológico. O paciente portador de psoríase normalmente sofre com situações de embaraço, medo, depressão, problemas de autoestima e com a imagem corporal, o que afeta diretamente diversos aspectos de sua vida como o relacionamento pessoal, prática de esportes, sexualidade, cuidados pessoais e atividades no trabalho e na escola (SEELIGER et al., 2003; VAN DE KERKHOF et al., 2007).

A principal característica da psoríase é o aparecimento de placas avermelhadas e descamativas com as bordas bem delimitadas principalmente nos cotovelos, joelhos, couro cabeludo e região lombar. Existem diversas formas de manifestação da doença, sendo a mais comum, a psoríase vulgaris a qual pode se manifestar de forma moderada a severa variando de acordo com a área da superfície corporal envolvida e também com o impacto na qualidade de vida do paciente. Aproximadamente 20% dos pacientes com psoríase desenvolvem artrite psoriática que é uma manifestação extracutânea da doença bastante debilitante (SCHON; BOEHNCKE, 2005).

A psoríase, juntamente com tantas outras doenças inflamatórias cutâneas crônicas ainda não possui etiologia e fisiopatologia bem definidas. Essa falta de

informação prejudica principalmente o tratamento dessas doenças, pois não se consegue desenvolver fármacos que atuem em alvos específicos uma vez que esses alvos não são conhecidos. Ou ainda, o caráter multifatorial da patogenia dessas doenças dificulta o tratamento com compostos que atingem um único alvo. Atualmente os tratamentos terapêuticos disponíveis não são totalmente eficazes, sendo que aqueles que promovem melhorias no quadro do paciente promovem também uma gama de efeitos indesejáveis. Assim, a busca por novas estratégias que se mostrem seguras e eficazes em prevenir a formação de edema, o extravasamento plasmático e o recrutamento de mediadores inflamatórios é um caminho promissor para se encontrar terapias adequadas no combate de reações inflamatórias cutâneas excessivas (MAN et al., 2008; SEELIGER et al., 2003).

Especialmente para doenças inflamatórias crônicas, as quais possuem patogênese complexa, o desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos, com atividade anti-inflamatória, é de grande valia. Uma vez que o agente fitoterápico é composto de misturas complexas, seu efeito pode ser atingido através da interação e bloqueio de diversas vias inflamatórias ao mesmo tempo, sendo, portanto, eficaz contra doenças multifatoriais. Estudos clínicos têm demonstrado que a adição de agentes fitoterápicos tópicos como adjuvantes no tratamento da psoríase tem promovido a melhora do quadro clínico do paciente, quando comparado à terapia antipsoriática clássica (DENG et al., 2013).

2 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de fitoterápicos que possam ser inseridos nos protocolos terapêuticos de doenças inflamatórias crônicas parece bastante promissor, uma vez que por apresentarem formulação complexa, esses medicamentos atingem diversos alvos moleculares podendo, portanto controlar diferentes sintomas das doenças.

Embora o Brasil conte com uma biodiversidade única, poucos fitoterápicos brasileiros são derivados de espécies nativas, uma vez que existe uma grande lacuna no conhecimento das propriedades terapêuticas de plantas brasileiras.

Além disso, atualmente existe uma grande preocupação em relação a sustentabilidade da cadeia produtiva de plantas medicinais para o desenvolvimento de fitoterápicos, sendo portanto valorizada a produção à partir de espécies cultivadas e não selvagens.

Tendo em vista as questões levantadas, investigar a possível atividade biológica de *V. bifalcata* em um modelo de inflamação parece promissor. *Vochysia bifalcata* Warm., é uma espécie nativa de fácil acesso no estado do Paraná, de fácil cultivo e já explorada pelos nativos para fins econômicos e sociais. Uma vez que outras espécies do gênero *Vochysia* demonstram efeitos biológicos relacionados principalmente à atividade anti-inflamatória e antioxidante, é bem provável que *V. bifalcata* compartilhe de efeitos semelhantes, tornando-se um alvo potencial para o desenvolvimento de um fitoterápico brasileiro com efeito anti-inflamatório.

3 HIPÓTESE

A hipótese formulada nesse trabalho considera que o extrato obtido das folhas de *V. bifalcata* possui efeito anti-inflamatório quando administrado por via tópica em modelos de inflamação cutânea em camundongos. Uma vez que a hipótese se confirme, a potencial exploração das folhas dessa espécie para a produção de um fitoterápico ampliaria os benefícios socioeconômicos da cadeia produtiva da espécie.

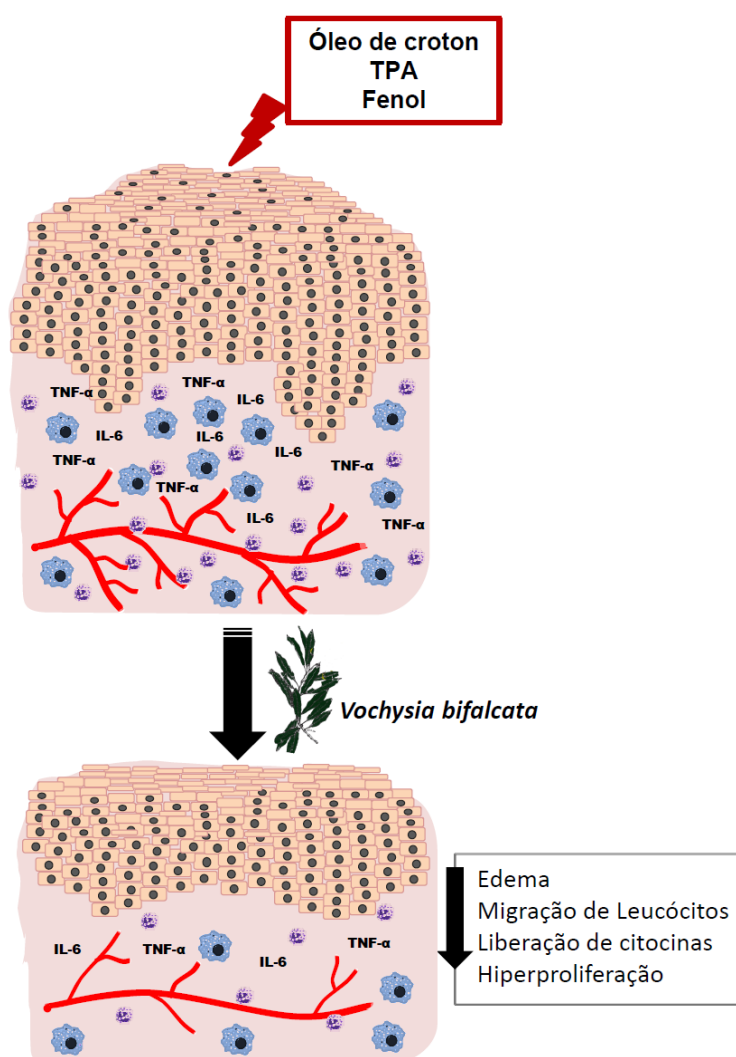


Figura 3. Hipótese. A aplicação tópica do extrato das folhas de *V. bifalcata* inibe parâmetros inflamatórios cutâneos induzidos por diferentes agentes flogísticos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade anti-inflamatória tópica do extrato hidroalcoólico das folhas de *V. bifalcata* (EHVB) em modelos de inflamação cutânea.

4.2 Objetivos Específicos

Verificar o efeito anti-inflamatório tópico do EHVB nos modelos de edema de orelha induzidos por óleo de cróton, 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA) e fenol em camundongos, através da avaliação da formação de edema e migração leucocitária;

Verificar a ação do EHVB sobre a hiperproliferação celular no modelo de edema de orelha induzido por aplicação repetida de óleo de cróton em camundongos, e em um modelo *in vitro* de cultura de queratinócitos epidérmicos (HaCaT);

Verificar a possível interação do EHVB com os receptores de glicocorticoides;

Verificar efeitos adversos cutâneos e sistêmicos desenvolvidos a partir do tratamento tópico com o EHVB em modelos de cicatrização e atrofia cutânea;

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material botânico

As folhas de *Vochysia bifalcata* foram coletadas na Reserva Natural do Rio Cachoeira, pertencente à Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental (SPVS), sob as coordenadas 25° 19' 15" S e 45° 42' 24" W, no município de Antonina, Estado do Paraná, Brasil, em janeiro de 2009, no período da manhã. A espécie foi identificada pela Dra. Kátia Christina Zuffellato-Ribas (Universidade Federal do Paraná, Curitiba) e um exemplar encontra-se catalogado (UPCB 67861) no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná.

5.2 Obtenção do Extrato

A obtenção do EHVB foi realizada pelo grupo de pesquisa coordenado pela Prof^a. Dr^a. Christiane Meyre da Silva Bittencourt do Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR), da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Itajaí-SC. Para a preparação do extrato, as folhas foram secas em estufa de secagem a 37 °C, posteriormente trituradas e submetidas à extração com etanol 70 °GL. Para tanto, 20 g do material vegetal foi colocado em contato com o líquido extrator na proporção 1:20 (p/v) e extraído sob agitação (330 rpm) a temperatura ambiente durante 4 horas. Então, o produto foi filtrado em papel filtro e submetido a evaporação do solvente sob pressão reduzida em evaporador rotatório. Após a eliminação do solvente, o extrato concentrado foi liofilizado e armazenado em frascos de cor âmbar, sendo conservado em temperatura média de 5 °C até a utilização.

5.3 Animais

Para a realização dos experimentos in vivo foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (25-35 g) provenientes do Biotério Setorial do Setor de Ciências Biológicas, SCB-UFPR. Os animais foram mantidos em condições de temperatura controlada (22 ± 2 °C), respeitando uma fase claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração comercial. Os animais foram mantidos na sala de experimento durante pelo menos 16 horas antes da realização dos testes, para adaptação. Os experimentos foram realizados de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratórios e os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná, sob o protocolo número 684 (CEUA-BIO, 2011).

5.4 Drogas e Reagentes

Para a execução dos protocolos experimentais foram utilizados etanol absoluto, polietilenoglicol 400, peróxido de hidrogênio, acetato de sódio, Tween 20, cloreto de sódio, hematoxilina, eosina, xilol, molibdato de sódio, glicerol, glicina, metanol, fosfato de sódio, cloreto férrico, sacarose, dextrana, ácido clorídrico, ácido etanosulfônico 4-(2-hidroxietil)piperazina-1 (HEPES), Triton X-100, ácido fosfomolibdico, Tris-HCl, ácido fosfotúngstico, biebrich scarlet, fucsina ácida e azul de anilina (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). Acetona, fenol, dimetilformamida, citrato de sódio, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), tolueno, carvão ativado, formaldeído, ácido acético glacial, Entellan e parafina (Merck Biosciences, Alemanha). Dexametasona, óleo de cróton, 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA), mifepristona, hexadeciltrimetilamônio (HTAB), tetrametilbenzidina (TMB), p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosamina, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), aprotinina, albumina de soro bovino (BSA), Ditiotreitól (DTT), 1,4-bis(5-fenil-2-oxazolil)benzeno (POPOP), 2,5-Difeniloxazol (PPO), brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), gelatina, bálsamo do Canadá e cloreto de benzetônio (Sigma-Aldrich Co.,

USA). Cetamina e xilazina (Syntec, Cotia, Brasil). Anticorpo policlonal anti-PCNA (sc-9857), anticorpo secundário conjugado à peroxidase (HRP – horseradish peroxidase, sc-2020) (Santa Cruz Biotechnology®, EUA), kit substrato diaminobenzidina (DAB) para peroxidase (BD Biosciences harmigen®, EUA). Meio dulbecco mem (DMEM), soro fetal bovino (SFB), tripsina (Cultilab, Campinas, Brasil) e estreptomicina/penicilina (Gibco, Life Technologies Corporation, USA). [³H]-dexametasona (Amersham, Buckinghamshire, UK).

5.5 Modelo de Edema de Orelha

O modelo de edema de orelha é um modelo animal de inflamação, bastante simples e prático o qual é frequentemente aplicado de maneira satisfatória na avaliação da atividade anti-inflamatória de compostos, assim como em estudos do processo inflamatório especialmente envolvendo doenças cutâneas como dermatites e psoríase. Entre as vantagens desse modelo, destaca-se a economia da substância a ser testada, uma vez que pequenas quantidades são suficientes para aplicação por via tópica. Além disso, o modelo fornece resultados rápidos e facilmente reproduzíveis (GABOR, 2003).

Para a aplicação desse modelo, a formação de edema foi avaliada através da verificação do aumento da espessura (µm) da orelha dos camundongos em resposta a um estímulo flogístico. Para verificar a espessura da orelha foi utilizado um micrômetro digital (MT-045B, Shangai Metal Great Tools Co., Ltd., Shangai, China) o qual foi aplicado na região próxima à extremidade medial da orelha. O edema foi determinado como a diferença entre a medida basal (anterior ao estímulo) e a medida após o estabelecimento do processo inflamatório. Para aplicação dos agentes flogísticos assim como dos tratamentos com drogas de referência ou com o extrato, as substâncias foram dissolvidas em um volume de 20 µL de solvente e então administradas por via tópica na face interna da orelha direita de cada animal. Para os agentes flogísticos e a dexametasona, a acetona foi utilizada como veículo, já o EHVB foi dissolvido em uma mistura de etanol:acetona (1:1). Para compor os grupos experimentais os animais foram divididos randomicamente, sendo o n (3-14) estabelecido de acordo com cada experimento. Os seguintes grupos foram

definidos: naive, animais que não receberam qualquer tratamento; veículo, animais que receberam etanol:acetona (1:1) apenas; controle, animais que foram estimulados com agentes flogísticos mas não foram tratados; *V. bifalcata*, animais tratados com diferentes concentrações do extrato após o estímulo flogístico; e dexametasona, animais tratados com diferentes concentrações de dexametasona, utilizada como fármaco de referência, após a indução com agente flogístico.

5.6 Dermatite de contato irritativa induzida por óleo de cróton ou TPA

O óleo de cróton contém uma mistura de ésteres de forbol dos quais o principal é o TPA. Quando aplicados sobre a pele, tanto o óleo de cróton quanto o TPA, são capazes de desencadear uma resposta inflamatória rápida e intensa, provocando aumento da permeabilidade vascular, com consequente formação de edema e intenso infiltrado leucocitário (GÁBOR, 2000). Assim, o processo inflamatório cutâneo foi induzido pela aplicação de óleo de cróton (0,4 mg/orelha) ou de TPA (2,5 µg/orelha) na orelha direita dos camundongos. O EHVB em diferentes concentrações (0,03-1,0 mg/orelha), assim como o fármaco de referência dexametasona (0,1 mg/orelha), foram aplicados logo em seguida aos agentes flogísticos nos grupos experimentais. A espessura da orelha foi verificada antes (basal) e 6 horas após a indução do processo inflamatório. Após 6 ou 24 horas, os animais foram eutanasiados e biópsias da pele das orelhas (biópsias de 6 mm) foram coletadas e submetidas a avaliação dos níveis de citocinas ou à análise histológica e a avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), respectivamente.

A fim de verificar o possível efeito do EHVB quando administrado por via oral sobre o edema de orelha induzido por TPA, os animais foram tratados por via oral com o extrato (300 mg/Kg) ou com dexametasona (3 mg/Kg) 30 minutos antes da aplicação tópica de TPA (2,5 µg/orelha) na orelha dos camundongos. Os tratamentos com EHVB e dexametasona foram dissolvidos em solução de NaCl 0,9%.

Para avaliar o possível envolvimento dos receptores de glicocorticóides na atividade anti-inflamatória do extrato, os animais foram pré-tratados com

mifepristona (50 mg/Kg, via subcutânea (s.c.)) dissolvida em polietilenoglicol 400, 15 minutos antes da aplicação tópica de TPA (2,5 µg/orelha), a qual foi seguida pelos tratamentos com EHVB (0,6 mg/orelha) ou dexametasona (0,001 mg/orelha) .

5.7 Dermatite de Contato Irritativa Induzida pela Aplicação Tópica de Fenol

A aplicação tópica de fenol promove irritação imediata da pele, mimetizando o processo inflamatório verificado na dermatite de contato humana (LIM; PARK; KIM, 2004). Nesse ensaio o edema foi induzido pela aplicação tópica de fenol 10% em acetona (20 µL/orelha) na orelha direita de camundongos. O EHVB (0,03 – 0,6 mg/orelha), assim como a dexametasona (0,1 mg/orelha), foram aplicados imediatamente após o fenol nos grupos experimentais. A espessura da orelha foi verificada antes (basal) e 2 h após a aplicação do agente flogístico.

5.8 Inflamação cutânea induzida pela aplicação repetida de óleo de cróton

A aplicação múltipla do óleo de cróton promove um processo inflamatório cutâneo com parâmetros que se assemelham a características de doenças inflamatórias crônicas, o que permite avaliar a ação anti-inflamatória do extrato frente a um processo inflamatório já estabelecido. O processo inflamatório crônico foi induzido pela aplicação do óleo de cróton (0,4 mg/orelha em 20 µL de acetona) em dias alternados durante 9 dias. O tratamento com o EHVB (1,0 mg/orelha) ou com a dexametasona (0,1 mg/orelha), teve início a partir do quinto dia de experimento, sendo aplicado por via tópica a cada 12 horas, durante 4 dias consecutivos e a espessura da orelha foi avaliada diariamente, um vez ao dia, no período da manhã (STANLEY et al., 1991). No 9º dia de experimento os animais foram eutanasiados e biópsias (6 mm) da pele das orelhas foram coletadas, pesadas e submetidas a avaliação da atividade das enzimas MPO e n-acetil-β-D glucosaminidase (NAG) e a análises histológica e imunohistoquímica.

5.9 Atrofia cutânea induzida por tratamento tópico com glicocorticoide

A atrofia cutânea é um dos efeitos adversos da aplicação tópica de glicocorticoides (AHN et al., 2006). Para avaliar se a aplicação tópica do EHVB promove atrofia da pele como um corticóide, os animais foram tratados por via tópica com dexametasona (0,1 mg/orelha) ou EHVB (1,0 mg/orelha) a cada 12 horas durante 7 dias, na ausência do estímulo inflamatório. A espessura da orelha dos animais foi avaliada no primeiro e no oitavo dia. Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados e biópsias das orelhas foram coletas para análise histológica. A aplicação repetida de glicocorticoide também promove alterações sistêmicas, normalmente desencadeando efeitos supressores sobre sistemas fisiológicos (AHN et al., 2006). Assim, ao final do experimento foram coletadas as adrenais, o timo e o baço os quais foram pesados a fim de verificar a possível influência dos tratamentos sobre esses órgãos.

5.10 Avaliação da Cicatrização pelo Método de Excisão

A aplicação tópica de glicocorticoides em lesões abertas prejudica a reparação tecidual. A fim de verificar a possível interferência do extrato sobre o processo cicatricial da pele, o modelo de cicatrização por excisão foi utilizado (FRANK; KAMPFER, 2003). Para tanto, os animais foram tricotomizados na região dorsal com o uso de creme depilatório (Veet[®], Brasil) e após 24 h foram anestesiados com cetamina (80 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) por via intraperitoneal, para a realização do procedimento de excisão. A excisão foi realizada com o auxílio de um punch para biópsia (6 mm de diâmetro) perfurando toda a espessura da pele. A biópsia foi retirada promovendo a formação de uma excisão circular no dorso de cada animal na região 3 cm abaixo do osso occipital, em uma área não alcançada pelo animal impedindo que o mesmo conseguisse alcançar, lamber ou coçar a ferida. Os animais foram tratados a cada 12 horas, durante 10 dias com 10 mg de creme base não iônico contendo EHVB 5% ou dexametasona 0,1%. O grupo controle foi tratado somente com o creme base. Para avaliação da cicatrização cada

ferida foi desenhada sobre uma folha de transparência, diariamente, sempre antes do primeiro tratamento do dia. A área obtida no dia zero, ou seja, imediatamente após o estabelecimento da lesão, serviu como padrão de referência do início do processo de cicatrização, o qual foi posteriormente comparado com os demais dias avaliados. A área da ferida foi quantificada utilizando o software Image Tool 3.0 (University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA). A taxa de cicatrização foi expressa como a porcentagem da área da ferida (cada dia após a excisão) comparada com a área inicial da ferida (dia zero = 100%). A dose do EHVB, que corresponde a aproximadamente 0,5 mg de extrato em cada aplicação, foi determinada em testes pilotos previamente realizados, enquanto a concentração da dexametasona foi baseada na concentração de formulações comercialmente disponíveis.

5.11 Avaliação da Atividade Enzimática da MPO e da NAG

A determinação da atividade das enzimas MPO e NAG foi realizada conforme descrito por De Young et al. (DE YOUNG et al., 1989). As amostras de tecido (biópsias, 6 mm) foram homogeneizadas em 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM pH 5,4 contendo 0,5% de HTAB durante 45 s a 0 °C, com o auxílio de um homogeneizador mecânico de tecidos (MA102/MINI – Marconi Equipamentos para Laboratório Ltda., Piracicaba-SP). O homogenato foi centrifugado a 11200 x g a 4 °C por 20 min em microcentrífuga de alta velocidade refrigerada (5415 R – Eppendorf do Brasil Ltda., São Paulo-SP). Para avaliação da MPO, triplicatas de 30 µL do sobrenadante foram transferidas para poços de placas de 96 poços, onde posteriormente foram adicionados 200 µL de uma mistura contendo 100 µL de tampão fosfato de sódio 80 mM pH 5,4, 85 µL de tampão fosfato de sódio (PBS) 0,22M pH 5,4 e 15 µL de uma solução aquosa de peróxido de hidrogênio 0,017%. A reação foi iniciada com a adição de 20 µL de TMB 18,4 mM dissolvidos em uma solução aquosa de dimetilformamida a 8%. A placa foi então incubada a 37 °C por 3 minutos, e a reação interrompida pela adição de 30 µL de acetato de sódio 1,46 M pH 3,0 em cada poço. De maneira semelhante, a atividade da NAG foi verificada transferindo-se 25 µL do sobrenadante para cada poço de uma placa de 96 poços,

também em triplicatas. Em seguida, foram adicionados 100 µL de tampão citrato 50 mM pH 4,5. A reação foi iniciada com a adição de 25 µL de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosamina 2,24 mM. A placa foi então incubada a 37 °C durante uma hora e a reação foi interrompida pela adição de 30 µL de tampão glicina 200 mM pH 10,4. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente através de um leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL808) com comprimento de onda de 620 ou 405 nm, para MPO ou NAG, respectivamente, sendo expressa como Absorbância/Biópsia.

Para comprovar a atividade do extrato sobre a migração leucocitária e excluir a possibilidade de uma possível inibição direta do extrato sobre a atividade das enzimas, 20 µL de diferentes concentrações do extrato (0,03 – 100 µg/mL) foram incubadas com 30 µL do homogenato de orelhas submetidas apenas ao estímulo com TPA ou óleo de cróton (múltiplas aplicações), os quais contêm altos níveis das enzimas. A mistura foi incubada durante 15 minutos, e então os protocolos foram seguidos conforme descrito acima.

5.12 Avaliação dos níveis das citocinas inflamatórias TNF-α e IL-6

Para avaliar o efeito do EHVB sobre a liberação de citocinas no processo inflamatório induzido pela aplicação tópica de TPA, as amostras foram preparadas da seguinte forma: as biópsias (6 mm) foram homogeneizadas em 2 mL de tampão específico (PBS, 0,05% de Tween 20, 0,1 mM de PMSF, 0,1 mM de Cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA, 2 µg/mL de Aprotinina, 0,5% de BSA e 0,4 M de NaCl) durante 45 s a 0 °C, com o auxílio de um homogeneizador mecânico de tecidos (MA102/MINI – Marconi Equipamentos para Laboratório Ltda., Piracicaba-SP). Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 3000 g e 4 °C por 10 min, em microcentrífuga de alta velocidade refrigerada (5415 R – Eppendorf do Brasil Ltda., São Paulo-SP). Os sobrenadantes foram então coletados e armazenados à -70 °C até o momento da análise. A detecção dos níveis de citocinas nas amostras foi realizada através de Kit de ensaio imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA) (Ready-Set-Go®, 88-7064 e 88-7324, eBioscience, Inc., San Diego, USA) conforme instruções do fabricante.

5.13 Avaliação do tecido cutâneo através de análise histológica

Para análise histológica, as biópsias das orelhas foram fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool 80%, 10 mL de formaldeído 40% e 5 mL de ácido acético glacial) durante 16 horas, sendo em seguida conservadas em álcool 70 °GL até o início do processo de desidratação. As amostras foram então desidratadas em banhos sucessivos em concentrações crescentes de álcool e xilol (Tabela 5). Em seguida, as amostras foram incubadas em um banho de parafina à 60 °C durante 2 horas e então emblocadas individualmente em blocos de parafina. Após completo resfriamento, os blocos foram seccionadas em cortes de 5 µm com o auxílio de um micrótomo (RM2135, Leica Biosystems, Alemanha) e os cortes acomodados em lâminas de vidro contendo uma solução de albumina de Meyer. Após secagem, as lâminas foram desparafinadas e hidratadas em sucessivos banhos de xilol e álcool conforme tabela 5. Em seguida, as lâminas foram submetidas à coloração com hematoxilina e eosina (HE) ou Tricrômico de Masson. Para coloração com HE, as lâminas foram expostas a hematoxilina de Harris durante 1,5 min e em seguida lavadas em água corrente por 10 min. As lâminas foram então lavadas em dois banhos de água destilada e em seguida expostas à eosina por 2 min e então desidratadas conforme a bateria de montagem da tabela 5. Para a coloração com Tricrômio de Masson, as lâminas foram coradas com solução de hematoxilina férrica de Weigert por 10 min. Em seguida enxaguadas com água corrente por 10 min e lavadas com água destilada, rapidamente. As lâminas foram então expostas a Biebrich-scarlet fucsina ácida durante 15 min e lavadas duas vezes com água destilada. Em seguida, as lâminas foram incubadas em solução de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico 5% durante 15 min e transferidas diretamente para solução de azul de anilina por 5 min. As lâminas foram lavadas rapidamente em água destilada e diferenciadas em solução de ácido acético 1% por 20 min. Por fim, foram lavadas com água destilada e em seguida expostas a bateria de montagem conforme tabela 5. Em ambas as colorações, após o último banho de xilol, as lâminas foram montadas com o meio resinoso balsamo do Canadá e lamínula. A infiltração de leucócitos, o edema e a espessura da epiderme ou da orelha foram avaliados em áreas representativas com aumento de 200x e/ou 400x. A quantificação do número de células presentes na derme ou a espessura das

estruturas foi realizada através da contagem dessas células e da espessura (μm) por campo com aumento de 400x, sendo analisados cinco campos de três cortes histológicos distintos de três animais por grupo. As análises foram realizadas com auxílio do software ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, Bethesda, Maryland, USA). A média de cada animal foi utilizada para a construção do gráfico e análise estatística (OTUKI et al., 2005).

TABELA 5 – ETAPAS DA PREPARAÇÃO DE CORTES HISTOLÓGICOS.

Desidratação		Desparafinização/ Hidratação		Montagem	
Álcool 70%	30'	Xilol I	5'	Álcool 70%	30''
Álcool 80%	30'	Xilol II	5'	Álcool 80%	30''
Álcool 90%	30'	Álcool + xilol (1:1)	5'	Álcool 90%	30''
Álcool 95%	30'	Álcool 100% I	5'	Álcool 95%	5'
Álcool 100% - I	30'	Álcool 100% II	5'	Álcool 100% - I	3'
Álcool 100% - II	30'	Álcool 95%	5'	Álcool 100% - II	3'
Álcool 100% - III	30'	Álcool 90%	5'	Álcool 100% - III	3'
Álcool 100% + Xilol (1:1)	30'	Álcool 80%	5'	Álcool/ Xilol (1:1)	5'
Xilol I	30'	Álcool 70%	5'	Xilol I	5'
Xilol II	10-15'	Lavar em água corrente	10'	Xilol II	5'
Xilol III	2,5-5'	2 banhos em água destilada			

Fonte: o autor, 2013.

5.14 Verificação da expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)

A análise imunohistoquímica permite a avaliação da expressão de marcadores celulares, como o PCNA que foi descrito como marcador da atividade proliferativa. Para verificar a expressão de PCNA, amostras de orelhas de animais submetidos à aplicação múltipla de óleo de cróton foram emblocadas em parafina e seccionadas em cortes de 5 μm em um micrótomo. Os cortes histológicos foram acomodados em lâminas previamente gelatinizadas. As lâminas foram submetidas a banhos de xilol para desparafinização e em seguida, hidratadas com banhos sucessivos em concentrações de álcool etílico decrescentes (como descrito no item 5.13). As lâminas foram então submetidas a um banho de glicina 0,1 M por 2 min para o bloqueio dos radicais aldeídos. Em seguida as lâminas foram lavadas em

PBS e a peroxidase endógena e os sítios inespecíficos foram bloqueados com banhos de H_2O_2 3% em metanol (10 min) e PBS/BSA 1% (30 min), respectivamente, com banho de PBS entre os dois bloqueios. Os cortes foram então incubados com o anticorpo anti-PCNA (1:50; 4 $\mu\text{g/mL}$) durante duas horas a temperatura ambiente em câmara úmida. Após banho com PBS, as lâminas foram novamente incubadas, desta vez com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:50; 8 $\mu\text{g/mL}$) durante uma hora a temperatura ambiente em câmara úmida. As lâminas foram novamente lavadas com PBS e incubadas com kit contendo o cromógeno DAB durante 15 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas em banhos de PBS seguidos de água destilada e então contracoloradas através da exposição à hematoxilina de Harris por 5 min. Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente durante 10 min e os cortes foram desidratados com banhos sucessivos de 3 min em etanol em concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, 95% e 100%) e em xilol:etanol (1:1) e um ultimo banho de xilol. Em seguida as lâminas foram montadas com meio resinoso balsamo do Canadá e lamínula. A presença de células positivas para o marcador PCNA foi quantificada em áreas representativas com aumento de 400x em microscópio óptico. A quantificação foi realizada através da contagem do número de células positivas por campo, sendo analisados 5 campos de 3 cortes histológicos distintos de 3 animais de cada grupo. A média de cada animal foi utilizada para a construção do gráfico e análise estatística (HORINOCHI, C. D. et al., 2013).

5.15 Ensaio de ligação de receptores de glicocorticóide

A capacidade de ligação do glicocorticóide a seu receptor foi avaliada através do ensaio de ligação específica descrito por Kalami e Hubbard, com algumas modificações (KALAMI; HUBBARD, 1983). Os homogenatos de fígados provenientes de diferentes ratos foram preparados em tampão gelado na proporção 1/5 (p/v) composto por 320 mM de sacarose, 50 mM de Tris-HCl, 2 mM de DTT, 10 mM de PMSF, 20 mM de molibdato de sódio e 10% de glicerol (pH 7,2). Após o período de centrifugação (60 min, 10 000 x g, 4 °C) os sobrenadantes (1 mg de proteína) foram incubados com 25 nM de [^3H]-dexametasona e/ou o EHVB (0,3 – 300 $\mu\text{g/mL}$) ou dexametasona 10^{-5} M em tampão apropriado (10 mM de HEPES; 1

mM de EDTA e 20 mM de molibdato de sódio, pH 7,5) por 18 h à 0°C. O volume final da reação foi 100 µl. Após o período de incubação, ao tubo de ensaio foram adicionados 150 µl de uma suspensão formada por 2% de carvão ativado + 0,2% de dextrana (peso molecular 40 kDa). Este procedimento permite a separação do ligante radioativo livre por adsorção. Após centrifugação (10.000 x g, 5 minutos), 50 µl do sobrenadante foram transferidos para outro tubo de ensaio onde foi adicionado 500 µl de líquido de cintilação (58% de fluido de cintilação [6 g/l de PPO + 0,2 g/l de POPOP em tolueno], 34% de Triton X-100 e 8% de água ultrapura). Após vigorosa agitação, a radioatividade foi quantificada em um contador de cintilação líquida. A determinação da concentração protéica dos homogenatos foi feita através da absorção ultravioleta no comprimento de onda de 280 nm em cubetas de quartzo, assumindo que 1 unidade de absorbância 280 nm = 1 mg de proteína. Os resultados foram expressos como porcentagem de ligação específica da [³H]-dexametasona (FERREIRA et al., 2005).

5.16 Cultivo Celular

Para os experimentos *in vitro*, foi utilizada a linhagem de queratinócitos humanos HaCaT. As células foram mantidas rotineiramente em garrafas de cultivo contendo meio de cultivo DMEM suplementado com 10% de SFB, 10 µg/ml de estreptomicina e 10 U/ml de penicilina, em atmosfera umidificada com 5% CO₂ a 37°C. Para manutenção das células o meio foi trocado a cada 48 horas. No momento em que a monocamada celular se tornava confluenta, as células eram lavadas e incubadas durante 10 min com EDTA 2 mM. Em seguida as células eram incubadas com 1 mL de tripsina 0,25% durante 10 min à 37°C. Após o desprendimento do tapete celular, as células eram homogeneizadas com DMEM acrescido de 10% de SFB e a suspensão celular obtida era dividida em várias garrafas para subcultivo (GEORGE et al., 2010).

5.17 Avaliação da Viabilidade Celular

Para verificar a possível atividade citotóxica do EHVB sobre as células cutâneas, a viabilidade celular foi avaliada após a exposição das células ao extrato através do teste de redução do sal de tetrazólio MTT (MOSMANN, 1983). Para tanto, as células foram semeadas em placa de 96 poços (7×10^3 células/poço). Após 16 horas o meio de cultivo foi substituído por meio contendo diferentes concentrações do EHVB (0,003-100 $\mu\text{g/mL}$) ou etanol 1% utilizado como veículo de dissolução do extrato. Após 24 horas de exposição, o meio foi substituído por uma solução de MTT (0,5 mg/mL) e a placa incubada durante 3 horas a 37 °C. O MTT foi removido e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em 200 μL de etanol e a absorbância verificada em leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL808) a 570 nm .

5.18 Ensaio de Proliferação Celular

Para verificar a possível influência do EHVB sobre a proliferação de queratinócitos, as células HaCaT (7×10^3 células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços. Após 16 horas o meio foi substituído por 200 μL de meio contendo diferentes concentrações do EHVB (0,03 - 100 $\mu\text{g/mL}$) em meio de cultivo contendo 10% de SFB. Como controles da proliferação um grupo recebeu apenas 0,1% de SFB, concentração que não induz proliferação, enquanto outro grupo foi exposto ao meio contendo 10% SFB, o qual proporciona aumento da taxa proliferativa. A placa foi incubada mantendo as mesmas condições durante 24, 48 ou 72 horas, e então a proliferação celular foi avaliada através da medida da viabilidade celular pelo teste de MTT (item 5.17).

5.19 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), exceto para os valores das DE₅₀ (dose necessária para reduzir em 50% as respostas dos grupos tratados em relação ao grupo controle), que foram representados como a média geométrica acompanhada de seus respectivos intervalos de confiança de 95%. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida dos testes de múltipla comparação de Newman-Keuls ou Bonferroni, conforme necessidade. Valores de *P* menores do que 0,05 (*P*<0,05) foram considerados como indicativos de significância. Os cálculos foram realizados utilizando o Software estatístico GraphPad Prism version 5.00, San Diego Califórnia, EUA.

6 RESULTADOS

6.1 Efeito do EHVB na dermatite de contato irritativa induzida por óleo de cróton.

A aplicação tópica de óleo de cróton (0,4 mg/orelha) promoveu a formação de edema conforme verificado pelo aumento da espessura da orelha ($109,8 \pm 8,6 \mu\text{m}$). O EHVB quando aplicado por via tópica promoveu inibição da formação de edema, de maneira dose-dependente, demonstrando DE_{50} igual a 0,32 (0,26-0,39) mg/orelha e inibição máxima de $68,8 \pm 2,9\%$ (1,0 mg/orelha). O fármaco de referência, dexametasona (0,1 mg/orelha) também promoveu inibição da formação do edema, com inibição máxima de $68,3 \pm 3,9\%$ (Figura 4).

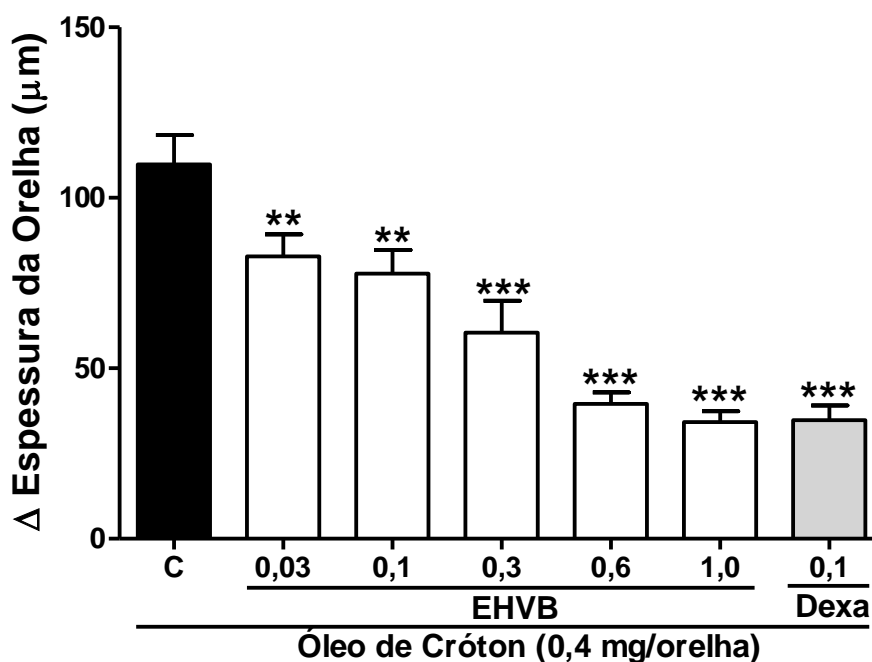


Figura 4. Curva dose-resposta do EHVB no modelo de edema de orelha induzido por Óleo de Cróton. O processo inflamatório foi induzido na orelha dos animais pela administração tópica de óleo de cróton (0,4 mg/orelha), em seguida, receberam o tratamento tópico com o extrato (0,03-1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha). Após 6 horas da aplicação do agente flogístico, a espessura das orelhas foi medida com o auxílio de um micrômetro. As barras representam a média \pm EPM ($n = 5-7$) do aumento da espessura da orelha. Os símbolos representam o índice de significância, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ quando comparados os grupos tratamento com o grupo controle.

A administração de óleo de cróton também promoveu o aumento da atividade da enzima MPO, a qual é utilizada como um indicativo de migração celular para o foco inflamatório. O tratamento tópico com EHVB foi capaz de inibir significativamente a atividade da enzima MPO apresentando inibição máxima de $60,7 \pm 3,0\%$ (1,0 mg/orelha), assim como a dexametasona, a qual, promoveu inibição de $65,0 \pm 2,2\%$ (Figura 5).

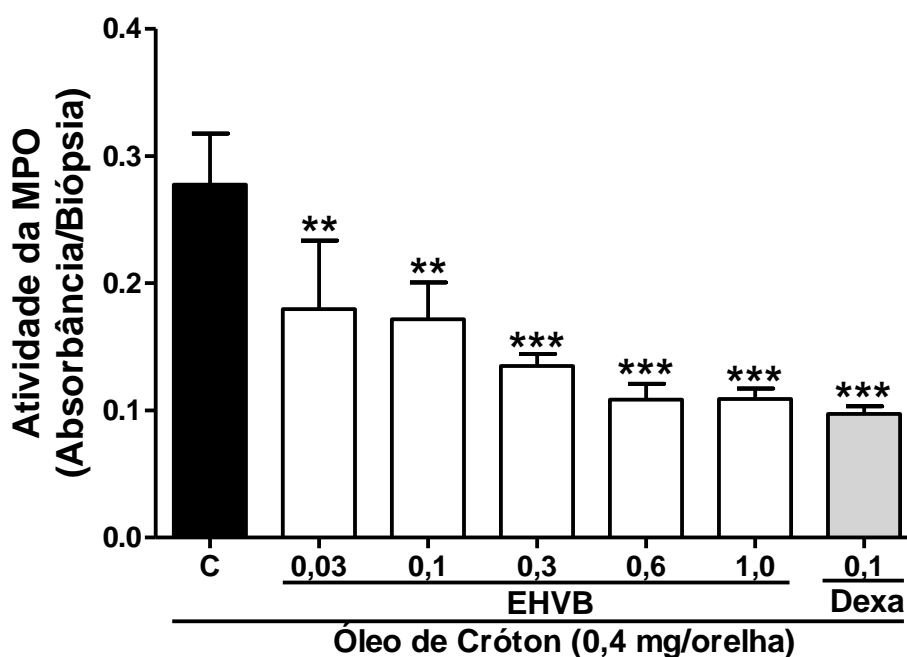


Figura 5. Efeito do tratamento tópico com EHVB sobre a atividade da MPO. O processo inflamatório foi induzido na orelha dos animais pela administração tópica de óleo de cróton (0,4 mg/orelha), em seguida receberam o tratamento tópico com o extrato (0,03-1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha). Após 24 horas da aplicação do agente flogístico, amostras de tecido (6 mm) foram retiradas e utilizadas para avaliar a atividade da enzima MPO. As barras representam a média \pm EPM (n= 5-7). Os símbolos representam o índice de significância, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ quando comparados os grupos tratamento com o grupo controle.

Para verificar se o extrato estaria inibindo diretamente a atividade da enzima e não a migração de leucócitos para o tecido inflamado, o efeito direto do extrato sobre a enzima foi avaliado através de um ensaio *in vitro*. Como observado na figura 6, as diferentes concentrações do extrato (0,03-100,0 µg/mL) não alteraram a atividade da enzima diretamente.

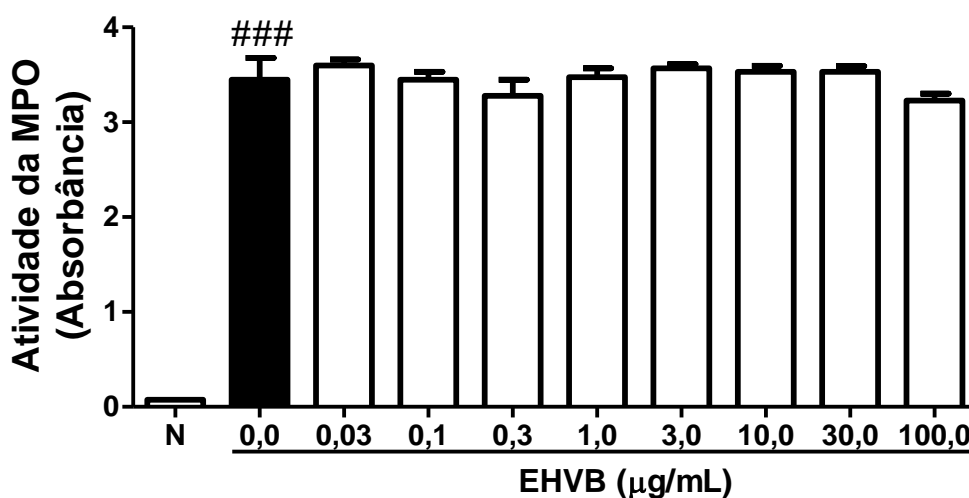


Figura 6. Efeito direto do EHVB sobre a atividade da enzima MPO *in vitro*. Os animais foram desafiados com TPA e após 6 h foram retiradas amostras (círculos de 6 mm de diâmetro) das orelhas dos animais. Os tecidos foram homogeneizados e o homogenato incubado durante 15 minutos com diferentes concentrações de EHVB (0,03-100,0 µg/mL) e então a atividade enzimática da MPO foi verificada. As barras verticais representam a média \pm EPM (n=3). O grupo naíve (N) foram orelhas coletadas de animais não desafiados. Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo naíve. ### $P < 0,001$.

Confirmando o efeito do extrato sobre a migração de células inflamatórias para o tecido, amostras das orelhas foram submetidas à análise histológica. Conforme observado na figura 7, a aplicação do óleo de cróton promoveu aumento da espessura da orelha assim como, aumento do número de células na derme.

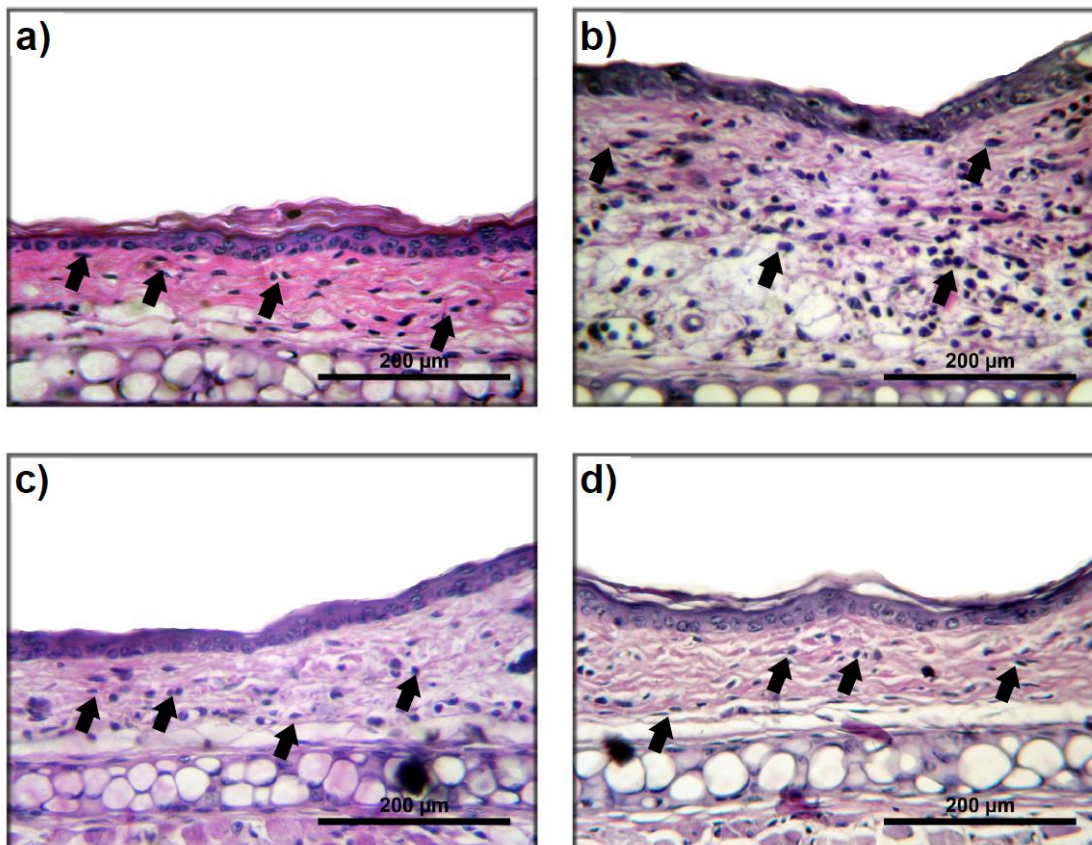


Figura 7. Fotos representativas dos cortes histológicos das orelhas dos camundongos desafiadas com óleo de cróton e tratadas com EHVB e dexametasona. Fotos representativas de cortes histológicos das orelhas dos camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton (0,4 mg/orelha) corados com HE, aumento de 400x, escala de 200 µm. Sendo representados, o grupo veículo (A), que recebeu apenas 20 µl de acetona:etanol (1:1)/orelha; o grupo controle (B) que recebeu apenas óleo de cróton + veículo; e os grupos tratados com extrato (1,0 mg/orelha) (C) ou dexametasona (0,1 mg/orelha) (D) após a indução com óleo de cróton. As setas indicam núcleos celulares.

A administração tópica do EHVB (1,0 mg/orelha) inibiu ambos os parâmetros demonstrando inibição da infiltração leucocitária de $59,1 \pm 2,5\%$ enquanto a dexametasona (0,1 mg/orelha) inibiu a migração leucocitária em $90,3 \pm 0,3\%$ (Figura 8).

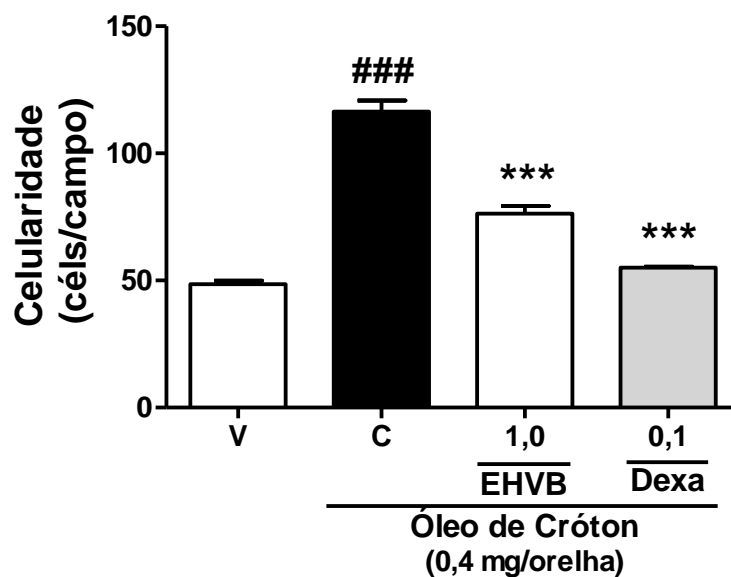


Figura 8. Efeito do EHVB (1,0 mg/orelha) e da dexametasona (0,1 mg/orelha) sobre a migração celular induzida pela aplicação tópica de óleo de cróton. A quantificação foi realizada através da contagem do número de células na derme, com aumento de 400x em cinco campos distintos de três cortes histológicos diferentes de três animais de cada grupo. As barras verticais representam a média \pm EPM (n=3). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C) ou veículo (V), respectivamente.***, ### $P < 0,001$.

6.2 Efeito do EHVB na liberação de citocinas induzida por TPA.

Outro parâmetro avaliado no modelo de inflamação cutânea aguda foi a liberação de citocinas inflamatórias. O tratamento com diferentes doses do EHVB por via tópica inibiu significativamente a liberação das citocinas TNF- α e IL-6 induzida pela aplicação tópica de TPA (2,5 μ g/orelha). EHVB promoveu inibição total da liberação de TNF- α ($100,0 \pm 1,3\%$; 1,0 mg/orelha), assim como a dexametasona ($100,0 \pm 1,3\%$; 0,1 mg/orelha) (Figura 9).

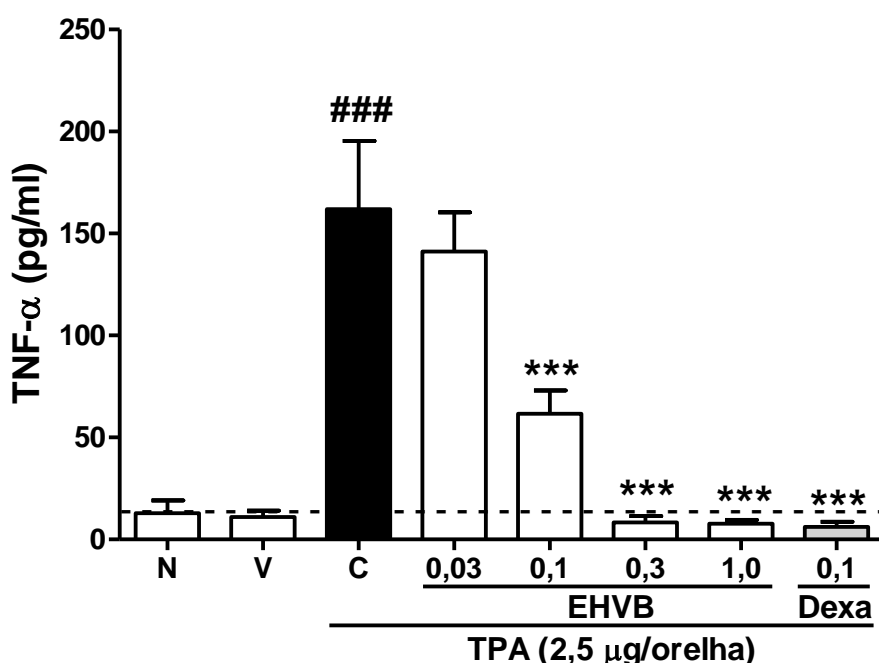


Figura 9. Efeito do EHVB e da dexametasona sobre a liberação de TNF- α induzida por TPA. O processo inflamatório foi induzido na orelha dos animais pela administração tópica de TPA (2,5 μ g/orelha), em seguida receberam o tratamento tópico com o extrato (0,03 – 1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha). Após 6 horas da aplicação do agente flogístico, amostras de tecido (6 mm) foram retiradas e utilizadas para a quantificação dos níveis de TNF- α por ELISA. As barras representam a média \pm EPM (n= 5). Os símbolos representam o índice de significância quando comparados os grupos tratamento com o grupo controle (C) ou veículo (V), respectivamente. ***, ###P<0,001 (N) representa o grupo naive.

De maneira semelhante, a liberação de IL-6 foi inibida totalmente ($100,0 \pm 11,1\%$; 1,0 mg/orelha) pela aplicação do extrato enquanto a dexametasona promoveu inibição máxima de $79,4 \pm 5,4\%$ (0,1 mg/orelha) (Figura 10).

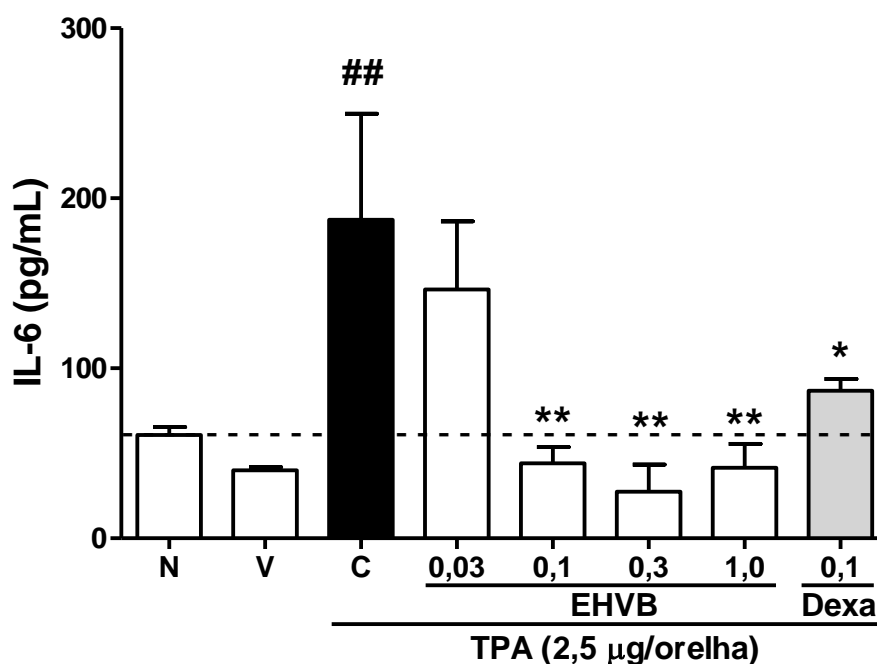


Figura 10. Efeito do EHVB e da dexametasona sobre a liberação de IL-6 induzida por TPA. O processo inflamatório foi induzido na orelha dos animais pela administração tópica de TPA ($2,5 \mu\text{g/orelha}$), em seguida receberam o tratamento tópico com o extrato (0,03 – 1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha). Após 6 horas da aplicação do agente flogístico, amostras de tecido (6 mm) foram retiradas e utilizadas para a quantificação dos níveis de IL-6 por ELISA. As barras representam a média \pm EPM ($n=5$). Os símbolos representam o índice de significância quando comparados os grupos tratamento com o grupo controle (C) ou veículo (V). * $P<0,05$, **,## $P<0,01$ (N) representa o grupo naíve.

6.3 Efeito da administração oral do EHVB na dermatite de contato irritativa induzida por TPA.

Na tentativa de verificar se a atividade anti-inflamatória tópica do extrato se sustentaria a partir da administração por via oral, os animais receberam uma dose de 300 mg/Kg do EHVB meia hora antes da indução do edema com TPA. Conforme evidenciado na figura 11, o EHVB manteve a capacidade de diminuir a formação de edema mesmo quando administrado por via oral, inibindo em $75,1 \pm 5,9\%$, enquanto a dexametasona (3,0 mg/Kg) causou inibição de $85,8 \pm 3,7\%$.

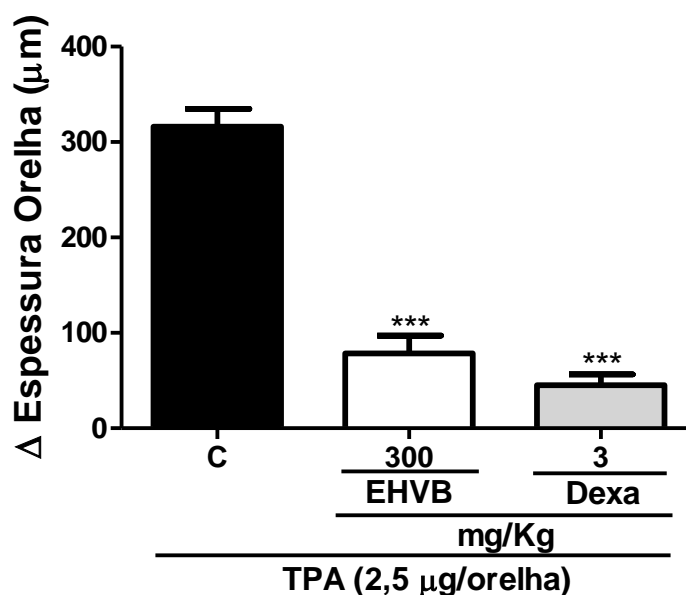


Figura 11. Efeito do EHVB administrado por via oral no modelo de edema de orelha induzido por TPA. Os animais foram pré-tratados com o extrato (300 mg/Kg) ou dexametasona (3,0 mg/Kg) 30 min antes da indução do processo inflamatório pela administração tópica de TPA (2,5 μg/orelha). Após 6 horas da aplicação do agente flogístico, a espessura das orelhas foi medida com o auxílio de um micrômetro. As barras representam a média \pm EPM (n= 5) do aumento da espessura da orelha. Os símbolos representam o índice de significância quando comparados os grupos tratamento com o grupo controle (C). *** $P < 0,001$.

Além da formação de edema, o extrato também inibiu o aumento da atividade da enzima MPO na pele quando administrado por via oral com inibição de $56,5 \pm 22,2\%$ enquanto a dexametasona inibiu $87,4 \pm 22,1\%$ (Figura 12).

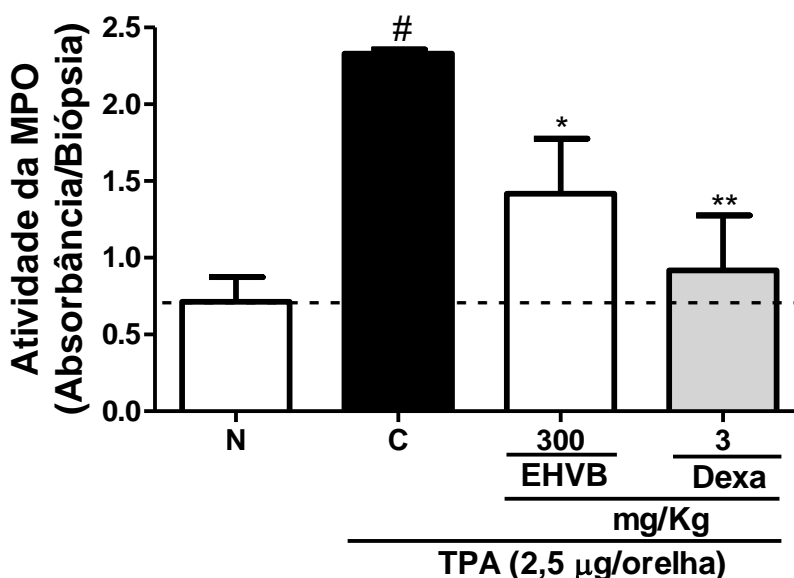


Figura 12. Efeito do tratamento por via oral com EHVB sobre a atividade da MPO. Os animais foram pré-tratados com o extrato (300 mg/Kg) ou dexametasona (3,0 mg/Kg) 30 min antes da indução do processo inflamatório pela administração tópica de TPA (2,5 µg/orelha). Após 24 horas da aplicação do agente flogístico, amostras de tecido (6 mm) foram retiradas e utilizadas para avaliar a atividade da enzima MPO. As barras representam a média \pm EPM (n= 5). Os símbolos representam o índice de significância quando comparados os grupos tratamento com o grupo controle (C) ou naíve (N). *,# $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

6.4 Efeito do EHVB na dermatite de contato irritativa induzida por fenol.

A atividade anti-inflamatória do extrato também foi verificada no modelo de dermatite de contato irritativa induzida por outro agente flogístico, o fenol. Os resultados apresentados na figura 13 demonstram que a aplicação tópica de fenol é capaz de promover a formação de edema de orelha em camundongos, e que a aplicação do EHVB (0,6 mg/orelha) foi eficaz em reverter esse processo, da mesma maneira que o controle positivo dexametasona, apresentando inibições máximas de $83,6 \pm 10,5\%$ e $78,4 \pm 10,7\%$, respectivamente.

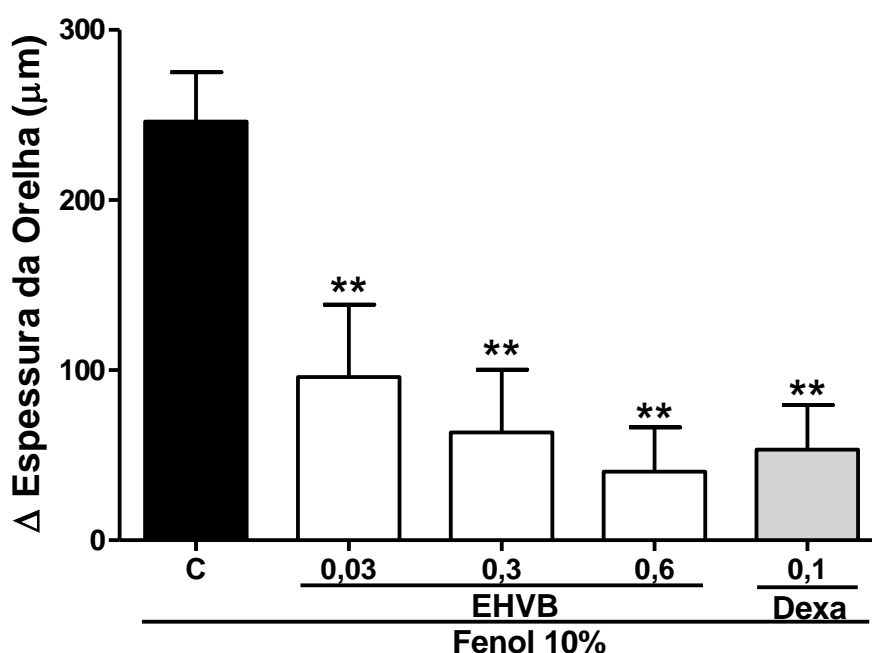


Figura 13. Efeito antiedematogênico do EHVB no modelo de edema de orelha induzido por fenol. O processo inflamatório foi induzido na orelha dos animais pela administração tópica de fenol 10%, em seguida, receberam o tratamento tópico com o extrato (0,03-0,6 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha) Após 2 horas da aplicação do agente flogístico, a espessura das orelhas foi medida com o auxílio de um micrômetro. As barras representam a média \pm EPM (n= 4-5) do aumento da espessura da orelha. Os símbolos representam o índice de significância quando comparados os grupos tratamento com o grupo controle (C). ** $P < 0,01$.

6.5 Efeito do EHVB na inflamação cutânea induzida pela aplicação repetida óleo de cróton.

Aplicações múltiplas de óleo de cróton na orelha dos camundongos promoveu uma resposta inflamatória crônica caracterizada por aumento na espessura da orelha, infiltrado inflamatório intenso e principalmente por aumento na espessura da epiderme. A administração do EHVB foi capaz de diminuir a resposta inflamatória estabelecida, conforme foi evidenciado pela diminuição da espessura da orelha com inibição de $70,2 \pm 5,6\%$ enquanto a dexametasona inibiu $89,1 \pm 1,8\%$, no nono dia de experimento (Figura 14).

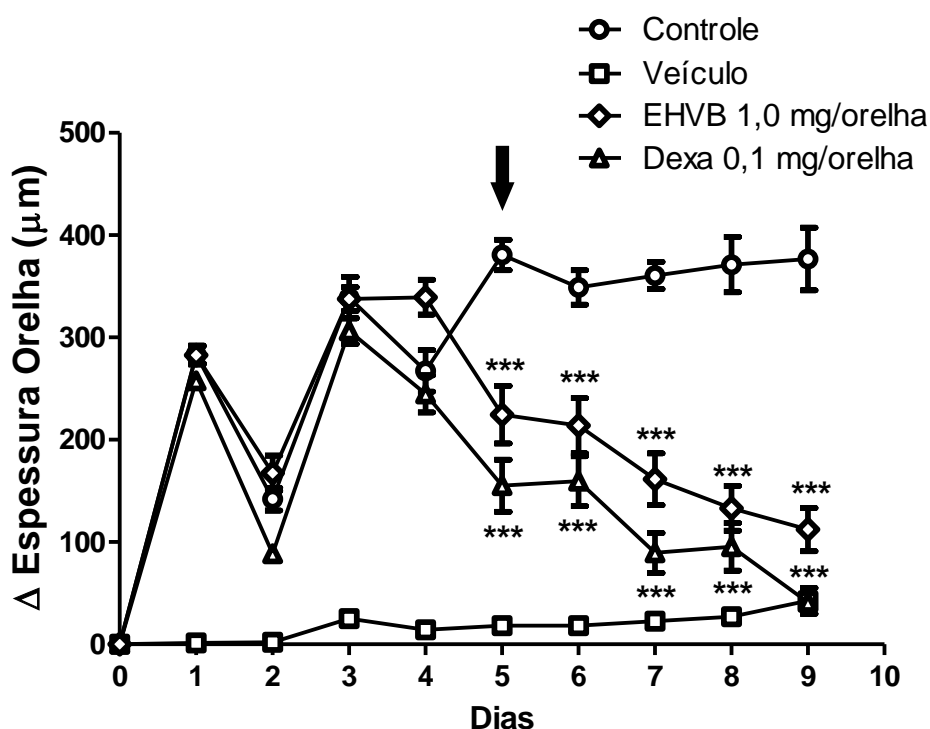


Figura 14. Efeito do EHVB no edema induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton. O processo inflamatório crônico foi induzido com a aplicação tópica de óleo de cróton (0,4 mg/orelha) em dias alternados durante 9 dias. O EHVB (1,0 mg/orelha) e a dexametasona (0,1 mg/orelha) foram aplicados topicamente durante 4 dias, duas vezes ao dia (12/12 h) a partir do quinto dia de experimento e a espessura da orelha medida diariamente. Os valores estão expressos como média \pm EPM ($n=5-8$). Os símbolos representam o nível de significância em relação ao controle (C). *** $P < 0,001$. (V) representa o grupo tratado apenas com o veículo (acetona:etanol (1:1)). A seta indica o início do tratamento.

A resposta antiedematogênica foi confirmada pelo efeito sobre o peso das biópsias de orelhas dos animais coletadas ao final do experimento (Figura 15). A aplicação repetida de óleo de cróton durante os nove dias, promoveu aumento do peso das orelhas ($18,2 \pm 1,3$ mg) enquanto os tratamentos com EHVB ou dexametasona inibiram esse aumento em $42,6 \pm 2,7\%$ e $77,3 \pm 1,9\%$, respectivamente.

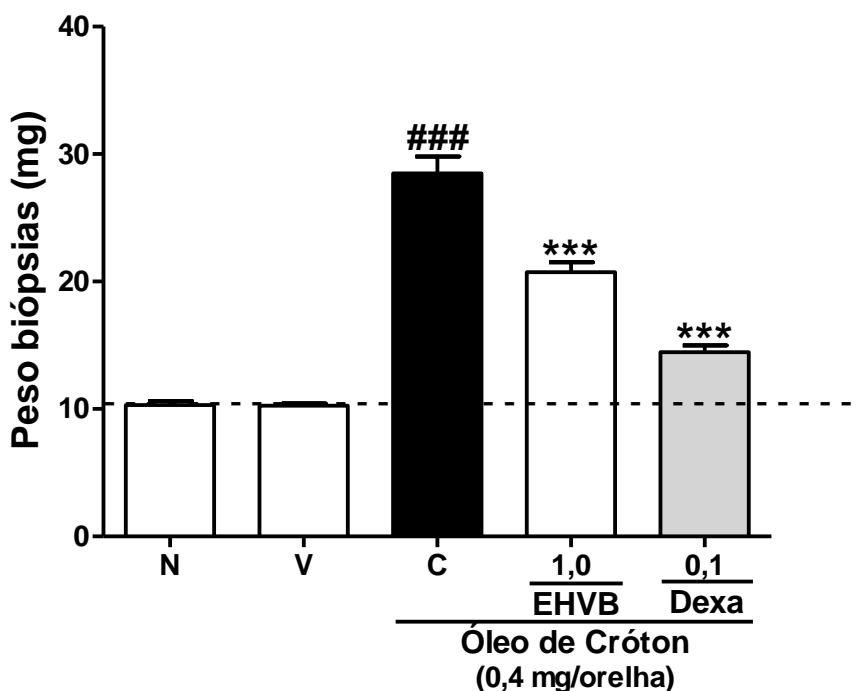


Figura 15. Efeito do EHVB sobre o aumento do peso das orelhas induzido por óleo de cróton. O processo inflamatório crônico foi induzido com a aplicação tópica de óleo de cróton (0,4 mg/orelha) em dias alternados durante 9 dias. O EHVB (1,0 mg/orelha) e a dexametasona (0,1 mg/orelha) foram aplicados topicamente durante 4 dias, duas vezes ao dia (12/12 h) a partir do quinto dia de experimento e a espessura da orelha medida diariamente. No último dia de tratamento amostras das orelhas foram coletadas e pesadas. Os valores estão expressos como média \pm EPM ($n=5-8$). Os símbolos representam o nível de significância em relação ao controle (C) ou veículo (V), respectivamente. ***, ### $P < 0,001$ (N) representa o grupo naivo.

Quando aplicado no modelo de inflamação induzida pela aplicação repetida de óleo de cróton, o EHVB foi capaz ainda de reduzir a atividade da enzima MPO (Figura 16) como um indicativo indireto da inibição da infiltração de células polimornucleares no tecido. A aplicação tópica do EHVB promoveu inibição de $55,1 \pm 7,3\%$ enquanto a dexametasona inibiu $96,0 \pm 3,4\%$.

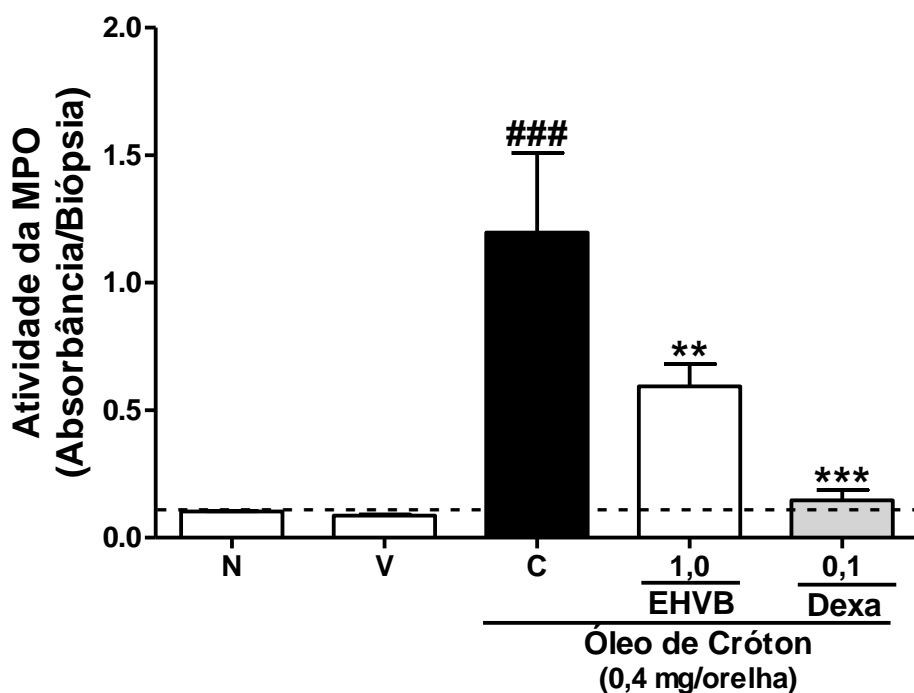


Figura 16. Efeito do EHVB e da dexametasona aplicados por via tópica na atividade da enzima MPO induzida pela aplicação múltipla de óleo de cróton. O processo inflamatório crônico foi induzido com a aplicação tópica de óleo de cróton (0,4 mg/orelha) em dias alternados durante 9 dias. O EHVB (1,0 mg/orelha) e a dexametasona (0,1 mg/orelha) foram aplicados topicamente durante 4 dias (2 vezes ao dia) após o quinto dia do início da aplicação do óleo de cróton. No último dia de tratamento amostras das orelhas foram coletadas e submetidas à análise da atividade da MPO. As barras verticais representam a média \pm EPM (n=5). Os símbolos representam o nível de significância em relação ao controle (C) ou veículo (V), respectivamente. ** $P < 0,01$; ***, ### $P < 0,001$ (N) representa o grupo naíve.

A aplicação múltipla de óleo de cróton promoveu também o aumento de células mononucleares no tecido, conforme verificado pela atividade da enzima NAG que atua como um indicativo indireto da infiltração de células mononucleares. Conforme observado na figura 17, o EHVB foi capaz de inibir a atividade da NAG em $23,7 \pm 4,4\%$, enquanto a dexametasona inibiu em $49,0 \pm 9,6\%$.

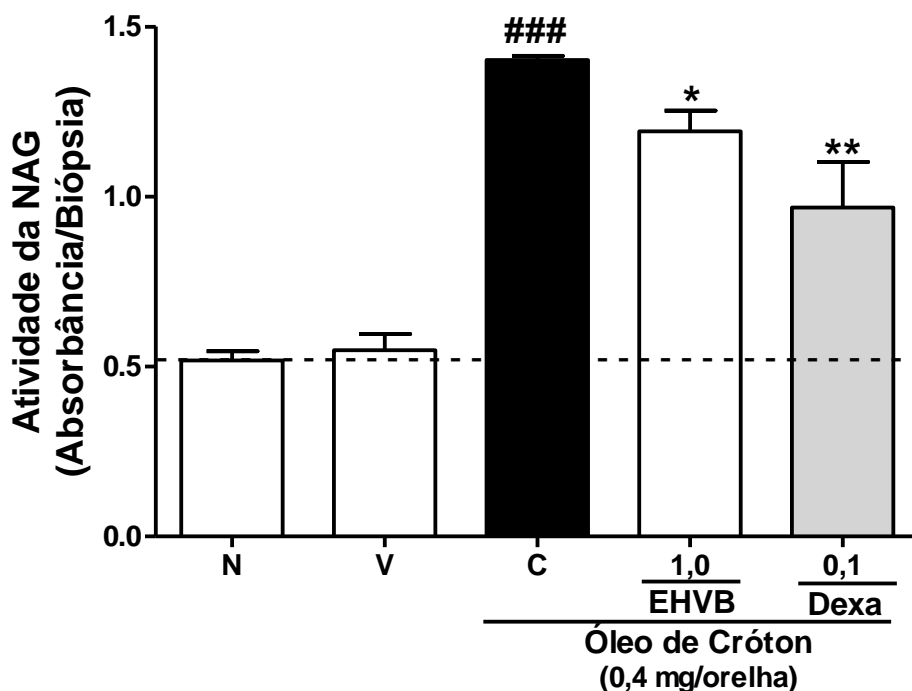


Figura 17. Efeito do EHVB e da dexametasona aplicados por via tópica na atividade da enzima NAG induzida pela aplicação múltipla de óleo de cróton. O processo inflamatório crônico foi induzido com a aplicação tópica de óleo de cróton (0,4 mg/orelha) em dias alternados durante 9 dias. O EHVB (1,0 mg/orelha) e a dexametasona (0,1 mg/orelha) foram aplicados topicamente durante 4 dias (2 vezes ao dia) após o quinto dia do início da aplicação do óleo de cróton. No último dia de tratamento amostras das orelhas foram coletadas e submetidas à análise da atividade da NAG. As barras verticais representam a média \pm EPM (n=5). Os símbolos representam o nível de significância em relação ao controle (C) ou veículo (V), respectivamente. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ (N) representa o grupo naíve.

Para verificar se o EHVB poderia estar inibindo diretamente a atividade da enzima NAG e não a migração de mononucleares para o tecido inflamado, a atividade do EHVB sobre a enzima foi verificada em um ensaio *in vitro*. Como observado na figura 18, as diferentes concentrações do extrato (0,03-100,0 µg/mL) não foram capazes de alterar a atividade da enzima quando em contato direto.

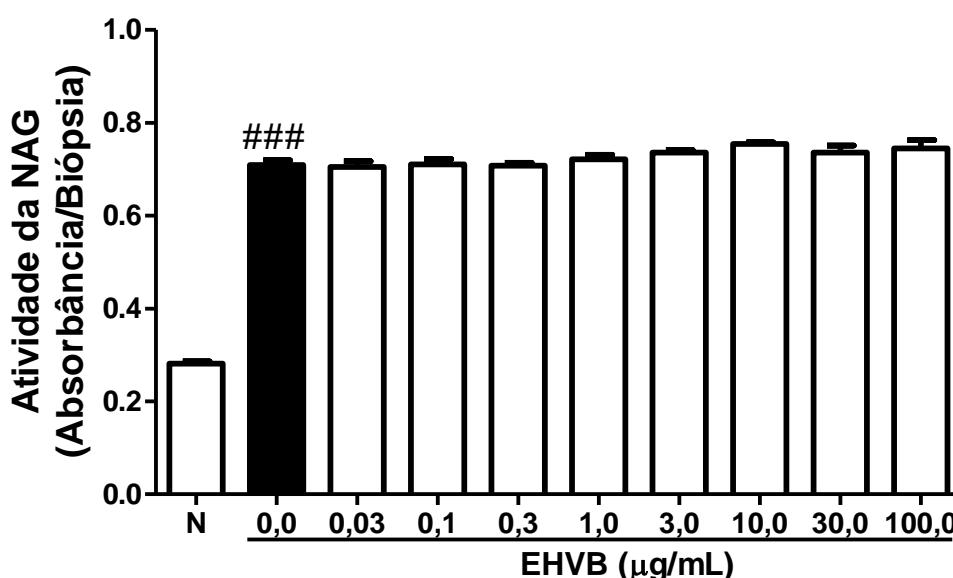


Figura 18. Efeito direto do EHVB sobre a atividade da enzima NAG *in vitro*. Os animais foram desafiados com óleo de cróton e após 9 dias foram coletadas amostras (círculos de 6 mm de diâmetro) das orelhas dos animais. Os tecidos foram homogeneizados e o homogenato incubado durante 15 minutos com diferentes concentrações de EHVB (0,03-100,0 µg/mL) e então a atividade enzimática da NAG foi verificada. As barras verticais representam a média ± EPM (n=3). O grupo naíve (N) foram orelhas coletadas de animais não desafiados. Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo naíve. ### $P < 0,001$.

Para confirmar o efeito do extrato sobre a infiltração celular induzida pela aplicação repetida de óleo de cróton, cortes histológicos foram preparados e analisados. As fotos representativas da figura 19 demonstram que o óleo de cróton promoveu o aumento de parâmetros inflamatórios como formação de edema e infiltração leucocitária.

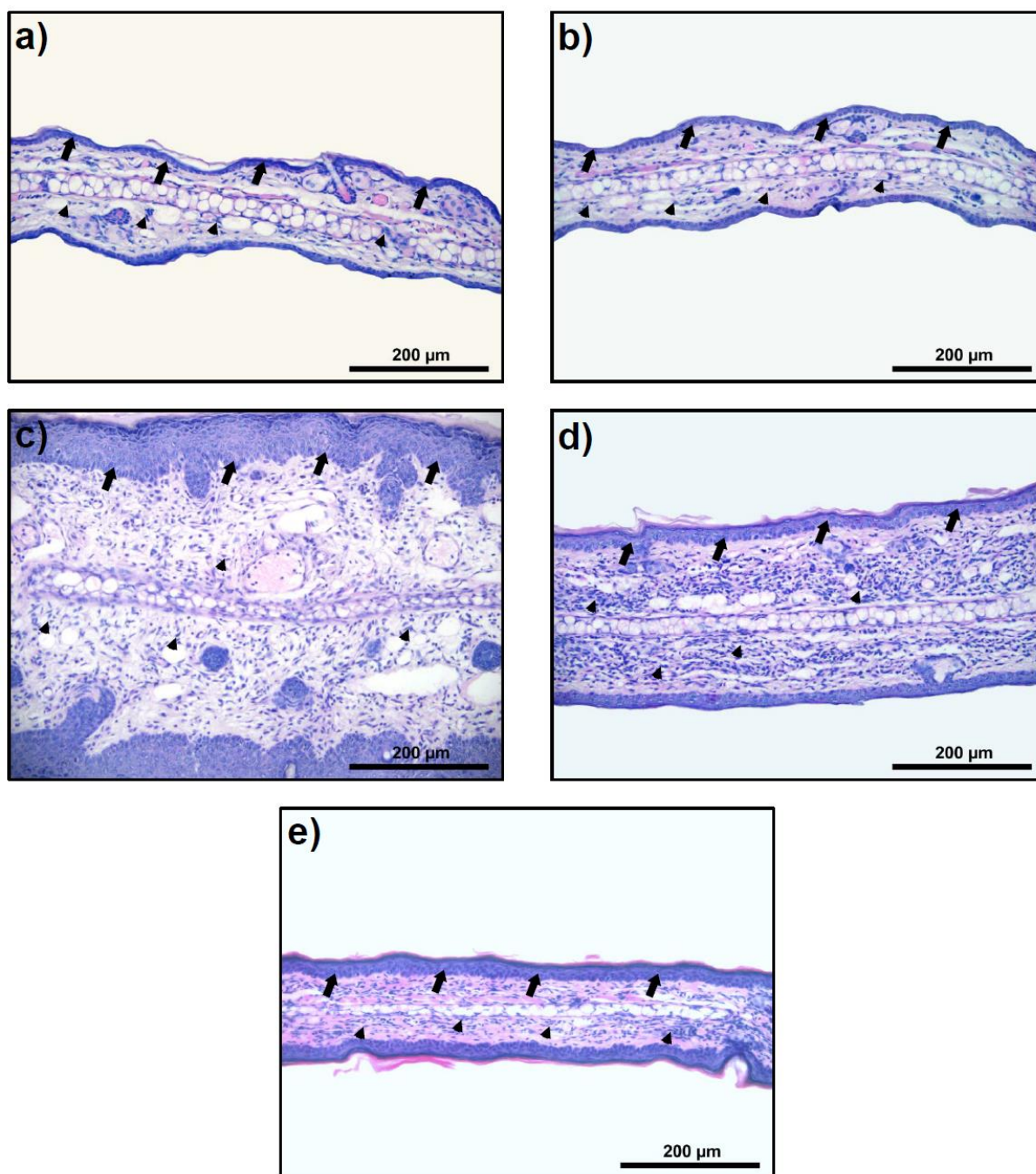


Figura 19. Fotos representativas dos cortes histológicos das orelhas dos camundongos desafiadas pela aplicação repetida de óleo de cróton e tratadas com EHVB e dexametasona. Fotos representativas de cortes histológicos das orelhas dos camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla óleo de cróton (0,4 mg/orelha) corados com HE, aumento de 200x, escala de 200 µm. Sendo representados, o grupo naïve (A), veículo (B) que recebeu apenas 20 µl de acetona:etanol (1:1)/orelha, o grupo controle (C), os grupos tratados com EHVB (1,0 mg/orelha) (D) ou dexametasona (0,1 mg/orelha) (E). As setas indicam a epiderme e as pontas de setas indicam núcleos celulares.

Através da quantificação do número de células na derme foi possível verificar que a aplicação tópica do EHVB inibiu a infiltração celular no tecido inflamado em $52,7 \pm 3,6\%$ enquanto a dexametasona inibiu $81,0 \pm 1,4\%$ (Figura 20).

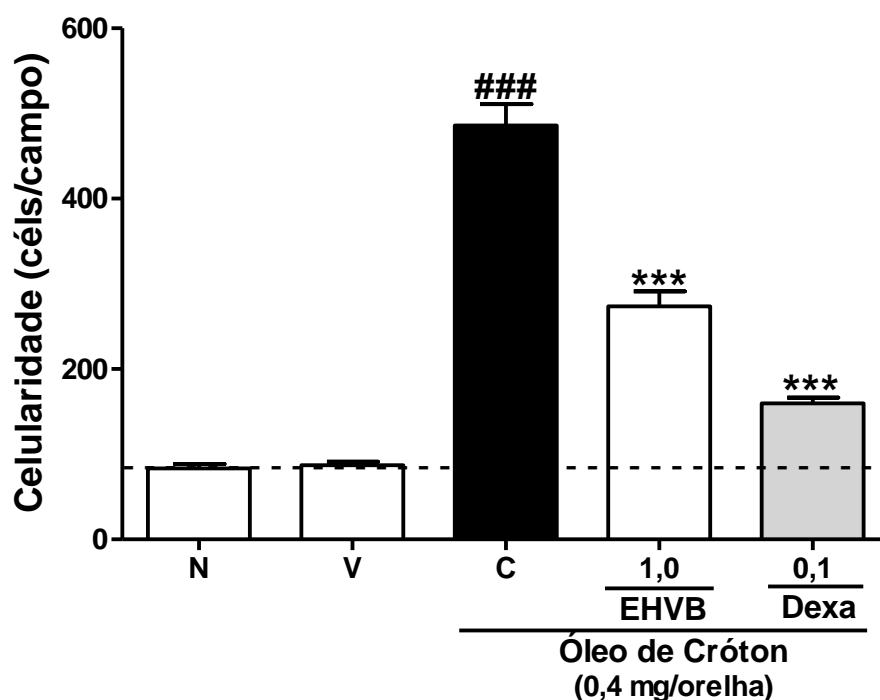


Figura 20. Efeito do EHVB (1,0 mg/orelha) e da dexametasona (0,1 mg/orelha) sobre a migração leucocitária induzida pela aplicação múltipla de óleo de cróton. A quantificação foi realizada através da contagem do número de células na derme, com aumento de 400x em cinco campos distintos de três cortes histológicos diferentes de três animais de cada grupo. As barras verticais representam a média \pm EPM ($n=4$). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C) ou veículo (V), respectivamente. ***, ### $P<0,001$.

Nesse modelo é possível ainda verificar o aumento da espessura da epiderme, promovida pela hiperproliferação dos queratinócitos. Através dos cortes histológicos, foi possível observar o efeito do EHVB sobre a hiperproliferação da epiderme induzida pelo óleo de cróton. Tanto o EHVB quanto a dexametasona foram eficazes em reduzir o aumento da espessura da epiderme em $50,8 \pm 4,4\%$ e $31,5 \pm 3,9\%$, respectivamente (Figura 21).

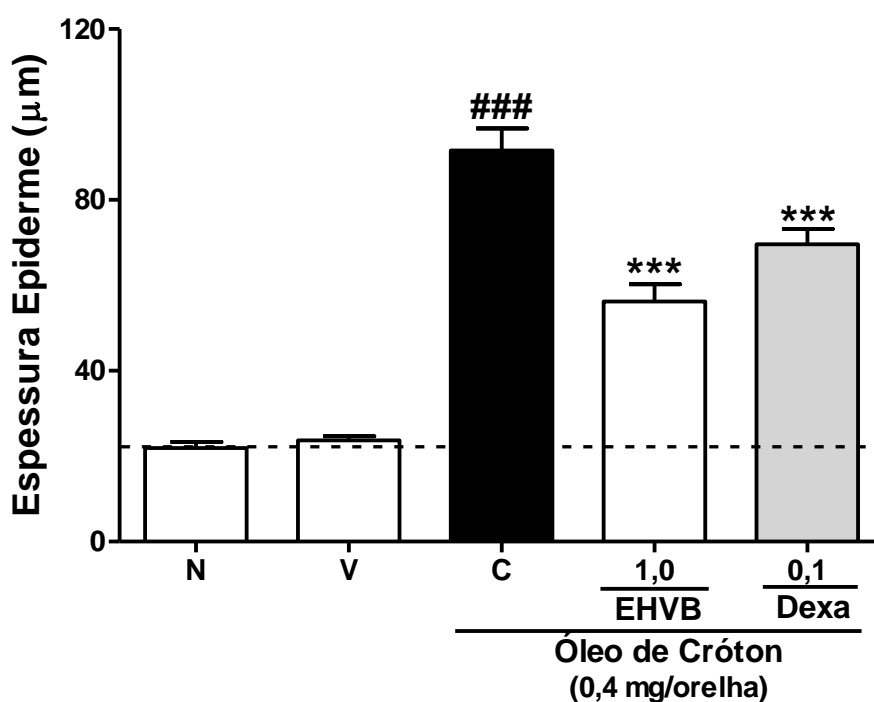


Figura 21. Efeito do EHVB (1,0 mg/orelha) sobre a hiperproliferação epidérmica no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton. A quantificação foi realizada através da medida da epiderme (μm) com aumento de 400x em cinco campos distintos de cortes histológicos de quatro animais de cada grupo. Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=4). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C) ou veículo (V), respectivamente. ***, ### $P < 0,001$.

Para confirmar que o efeito sobre a espessura da epiderme ocorre através da atividade antiproliferativa, os cortes histológicos foram submetidos à análise imunohistoquímica para a marcação do marcador de proliferação celular PCNA (Figura 22).

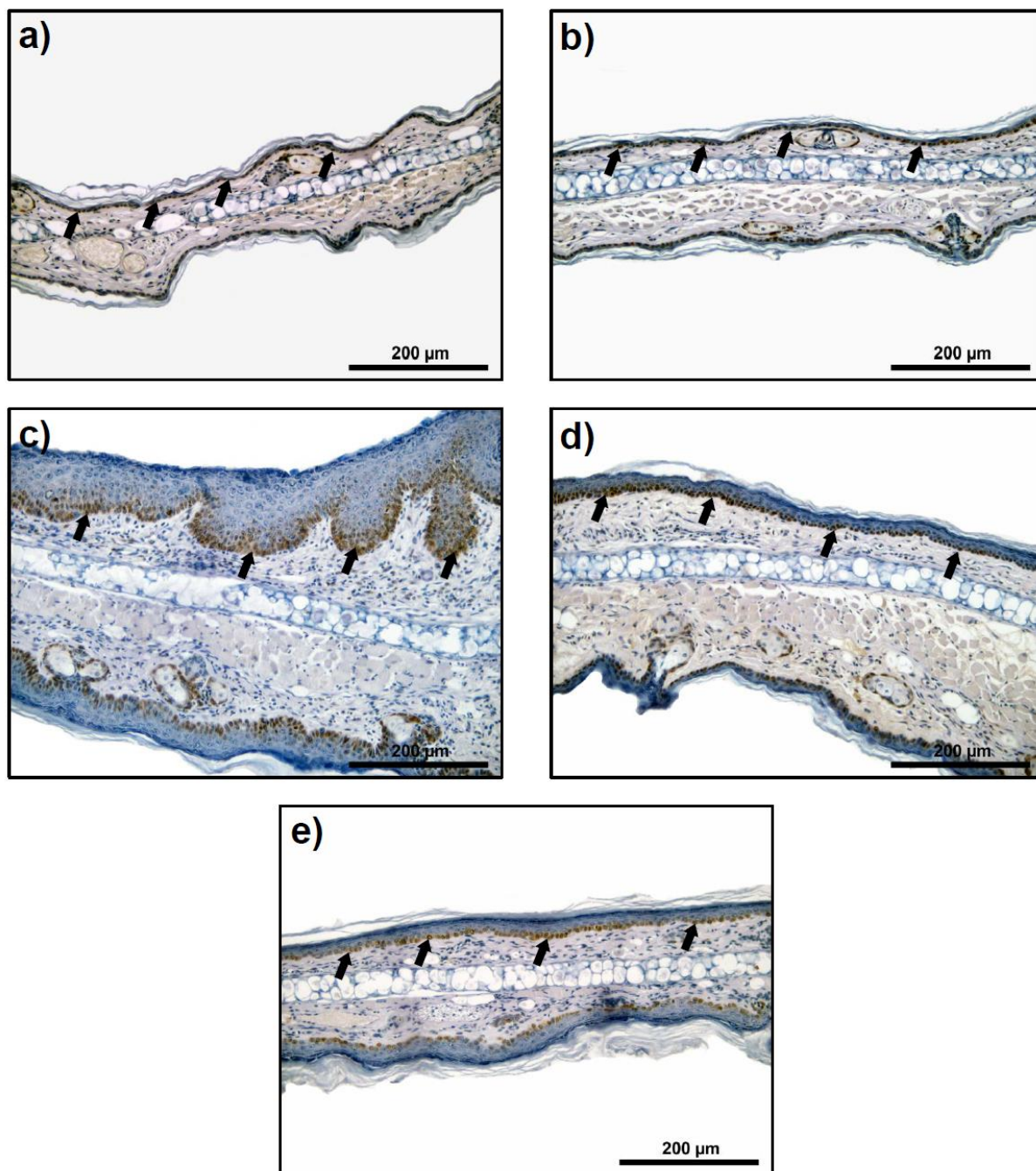


Figura 22. Fotos representativas da análise imunohistoquímica dos cortes histológicos de orelhas de camundongos, contra corados com HE (200x, escala de 200 µm), após aplicação de tratamento crônico com óleo de crôton. (a) naive, (b) veículo, (c) controle, (d) tratamento com EHVB (1,0 mg/orelha), e (e) dexametasona (0,1 mg/orelha). As células coradas em marrom são positivas para PCNA, conforme exemplos indicados pelas setas.

A aplicação do óleo de cróton promoveu um aumento no número de células positivas para PCNA e esse aumento foi significativamente reduzido pela aplicação tópica do EHVB, assim como com a aplicação da dexametasona, apresentando uma diminuição no número de células positivas para PCNA de $55,0 \pm 2,0\%$ e $76,6 \pm 4,1\%$ respectivamente (Figura 23).

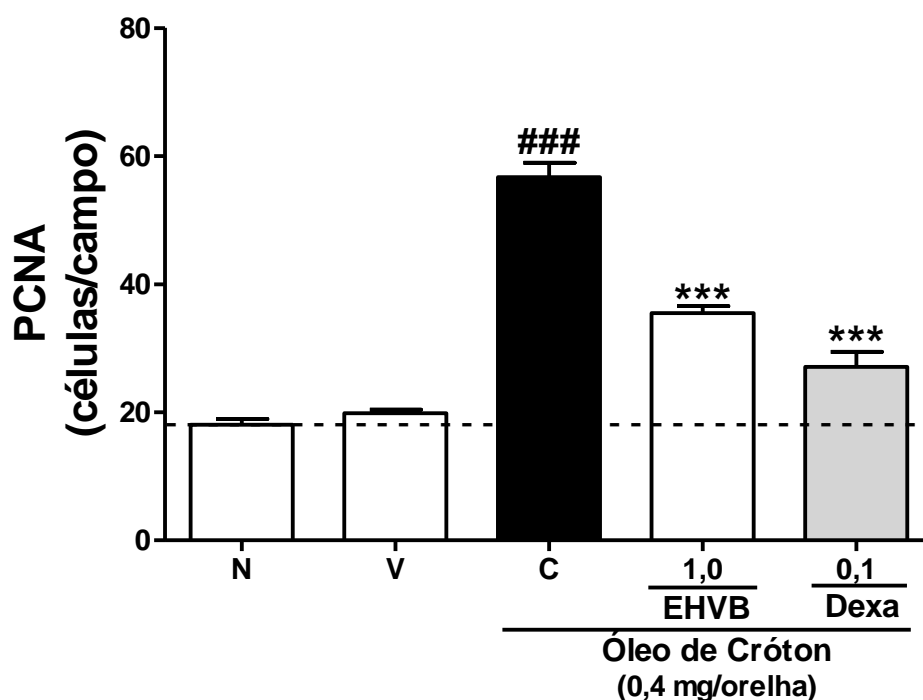


Figura 23. Efeito do EHVB (1,0 mg/orelha) e da dexametasona (0,1 mg/orelha) sobre a superexpressão epidérmica de PCNA induzida pela aplicação múltipla de óleo de cróton. A análise foi realizada através de imunohistoquímica e a quantificação realizada através da contagem das células positivas para PCNA com aumento de 400x em cinco campos distintos de cada corte histológico de quatro animais de cada grupo. As barras verticais representam a média \pm EPM (n=4). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C) ou veículo (V), respectivamente. ***, ### $P < 0,001$.

6.6 Efeito direto do EHVB sobre queratinócitos epidérmicos.

O efeito do EHVB foi avaliado diretamente sobre células HaCaT para verificar se o efeito antiproliferativo seria por ação direta do EHVB sobre os queratinócitos da pele. Inicialmente, a viabilidade celular dos queratinócitos foi verificada após exposição a diversas concentrações do EHVB. Conforme observado na figura 24, as diferentes concentrações do EHVB não foram capazes de alterar a viabilidade celular dos queratinócitos.

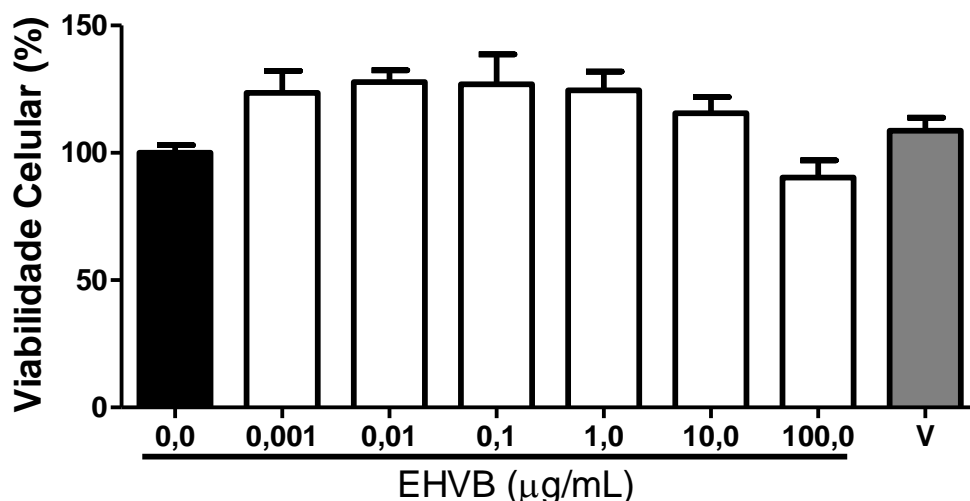


Figura 24. Efeito do EHVB na viabilidade de células HaCaT. As células foram expostas ao EHVB (0-100 µg/mL) e incubadas durante 24 horas. Para verificar a viabilidade celular as células viáveis foram quantificadas pelo método de MTT. Os resultados estão expressos como a porcentagem em relação ao grupo controle. As barras verticais representam a média \pm EPM (n=3). O grupo controle (0,0) recebeu apenas o meio de cultivo e o grupo veículo (V) recebeu tratamento com etanol 1% em meio de cultivo.

No intuito de avaliar se o EHVB apresentava atividade antiproliferativa quando aplicado diretamente sobre as células epidérmicas, a viabilidade celular foi verificada após o tratamento das células em um protocolo de proliferação celular. Entretanto, o extrato não demonstrou atividade antiproliferativa direta sobre as células HaCaT nos diferentes tempos testados (Figura 25).

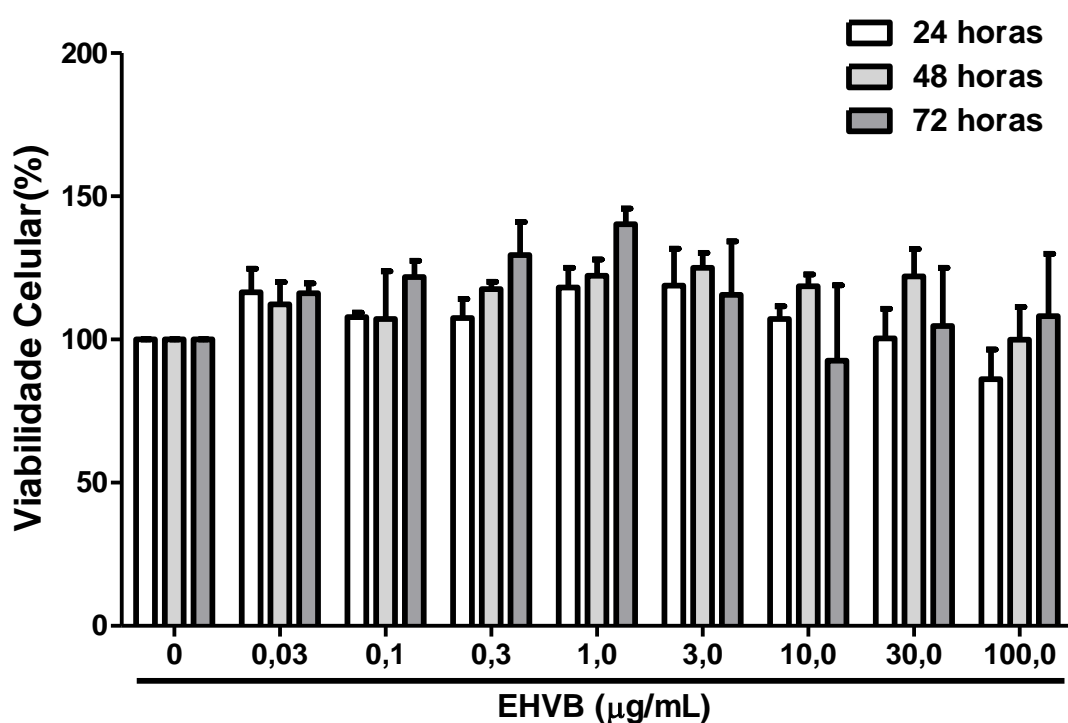


Figura 25. Efeito do EHVB sobre a proliferação de células HaCaT. As células foram expostas ao EHVB (0-100 μg/mL) e incubadas durante 24, 48 e 72 horas. Para verificar a viabilidade celular as células viáveis foram quantificadas pelo método de MTT. Os resultados estão expressos como a porcentagem em relação ao grupo controle. As barras verticais representam a média ± EPM (n=3). O grupo controle (0) recebeu apenas o meio de cultivo.

6.7 Avaliação do efeito do tipo glicocorticoide do EHVB.

Uma vez que as respostas verificadas com o EHVB mostraram-se eficazes de maneira comparável à eficácia da dexametasona, tornou-se interessante investigar se o extrato estaria agindo por mecanismos parecidos com o dos glicocorticoides. Primeiramente foram escolhidas doses efetivas baixas do EHVB e da dexametasona, com as quais foi realizado um co-tratamento tópico no modelo de dermatite de contato induzida por TPA para verificar a possível interação desses agentes. Como observado na figura 26, o tratamento combinado do EHVB com a dexametasona promoveu um efeito aditivo, sem demonstrar, portanto, potencialização da atividade inibitória.

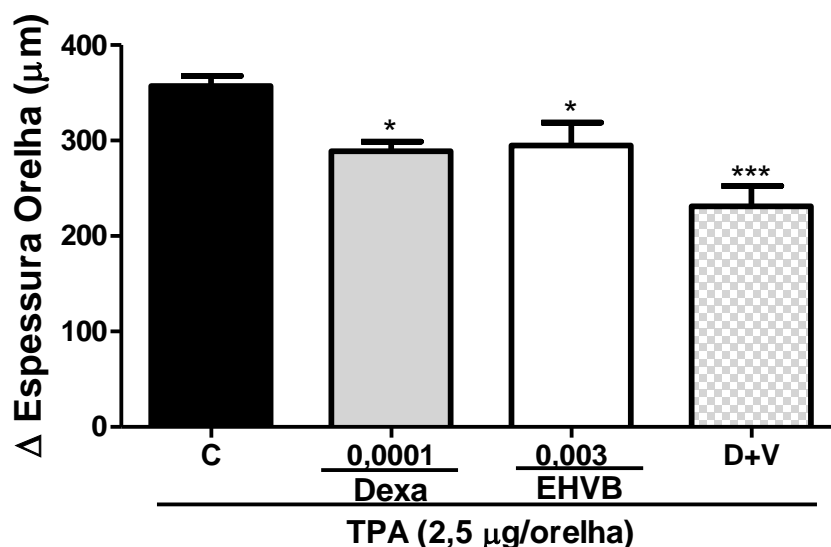


Figura 26. Efeito da associação de EHVB (0,003 mg/orelha) e dexametasona (0,0001 mg/orelha) administrados por via tópica no edema de orelha induzido pela aplicação de TPA. D+V representa o grupo que recebeu ambos os tratamentos. As barras verticais representam a média \pm EPM (n=5). Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo controle (C). * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$.

A aplicação da dexametasona isolada inibiu a formação de edema em $19,2 \pm 2,8\%$ enquanto o EHVB inibiu $17,5 \pm 6,8\%$, já o tratamento associado promoveu inibição de $35,2 \pm 3,9\%$. Por outro lado, a atividade da enzima MPO não sofreu alterações quando os tratamentos foram associados, sendo que a dexametasona promoveu inibição de $68,0 \pm 8,9\%$, o EHVB $63,7 \pm 9,5\%$ e o co-tratamento inibiu $67,2 \pm 7,8\%$ do aumento da atividade da MPO (Figura 27).

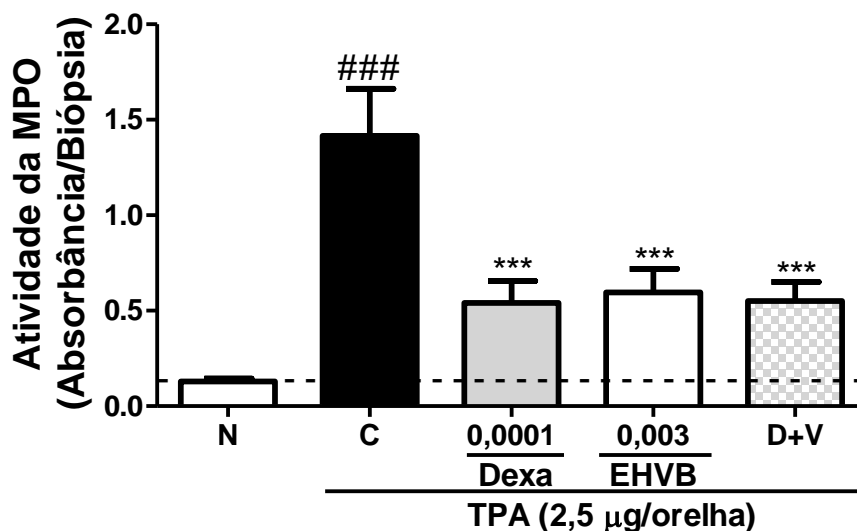


Figura 27. Efeito da associação de EHVB (0,003 mg/orelha) e dexametasona (0,0001 mg/orelha) administrados por via tópica sobre a atividade da enzima MPO. D+V representa o grupo que recebeu ambos os tratamentos. As barras verticais representam a média \pm EPM ($n=5$). Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo controle (C) ou naíve (N), respectivamente. ***, ### $P<0,001$.

Na tentativa de identificar um possível alvo do mecanismo de ação do EHVB, um antagonista dos receptores de glicocorticoides (mifepristona) foi administrado por via s.c. nos animais antes dos tratamentos. A aplicação tópica de TPA promoveu um aumento significativo na espessura das orelhas dos animais, o qual não sofreu alteração com a administração do veículo (PEG 400) por via subcutânea. Como observado, a aplicação tópica do extrato e da dexametasona inibiram a formação de edema em $25 \pm 6,6\%$ e $53,9 \pm 6,2\%$, respectivamente, sendo que o pré-tratamento com mifepristona foi capaz de inibir a resposta antiedematogênica do EHVB e da dexametasona, promovendo reversão total do efeito observado (Figura 28).

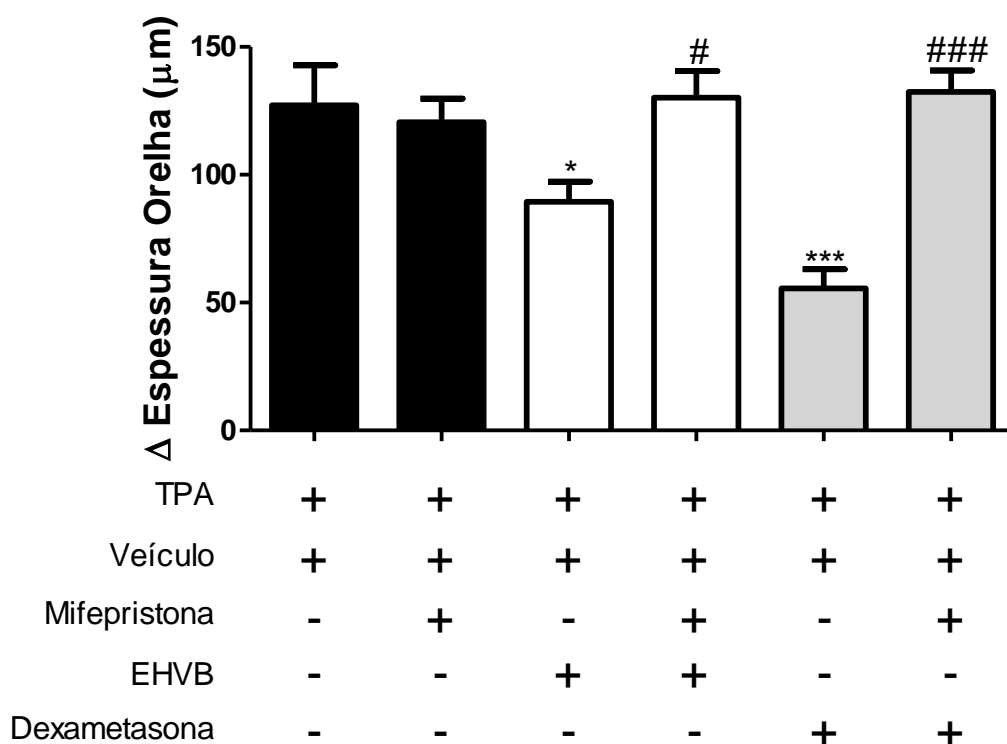


Figura 28. Reversão da atividade antiedematogênica de EHVB e dexametasona pela mifepristona. O EHVB (0,6 mg/orelha) e a dexametasona (0,001 mg/orelha) foram aplicados por via tópica imediatamente após o TPA. A mifepristona (50 mg/Kg, s.c.) foi administrada 15 minutos antes dos tratamentos. Veículo: polietilenoglicol 400, utilizado para a diluição da mifepristona. As barras verticais representam a média \pm EPM (n=5). O aumento da espessura da orelha foi verificado 6 horas após a aplicação do TPA. Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo TPA+Mifepristona ou aos grupos pré-tratados com mifepristona, respectivamente. *,# $P < 0,05$ e ***, ### $P < 0,001$.

Entretanto o mesmo não foi observado com a atividade da MPO. A aplicação por via subcutânea do veículo não alterou a atividade da MPO, enquanto os tratamentos tópicos com EHVB ou dexametasona inibiram a atividade enzimática em $76,6 \pm 3,2\%$ e $75,2 \pm 1,8\%$, respectivamente. O pré-tratamento com o antagonista não reverteu de maneira significativa o efeito inibitório dos tratamentos com EHVB ou dexametasona sobre a atividade enzimática da MPO (Figura 29).

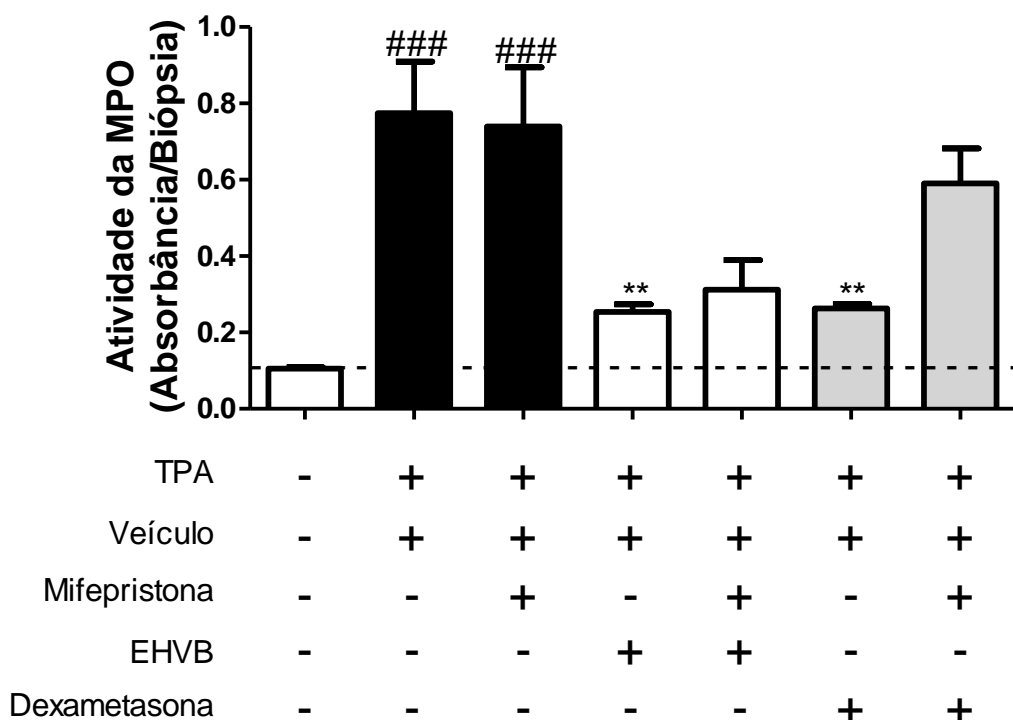


Figura 29. Efeito da mifepristona sobre a atividade inibitória do EHVB e dexametasona sobre a atividade da MPO. O EHVB (0,6 mg/orelha) e a dexametasona (0,001 mg/orelha) foram aplicados por via tópica imediatamente após o TPA. A mifepristona (50 mg/Kg, s.c.) foi administrada 15 minutos antes dos tratamentos. Biópsias foram coletadas 24 horas após a aplicação do TPA para avaliação da atividade da MPO. Veículo: polietilenoglicol 400, utilizado para a diluição da mifepristona. As barras verticais representam a média \pm EPM (n=5). Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo TPA+Mifepristona ou aos grupos pré-tratados com mifepristona, respectivamente. *, # $P < 0,05$ e **, ### $P < 0,001$.

Para confirmar a interação do EHVB com o receptor de glicocorticoide, foi realizado o ensaio de ligação específica da $[^3\text{H}]$ -dexametasona em fígado de ratos. Os resultados demonstraram que a ligação da $[^3\text{H}]$ -dexametasona foi reduzida pelo tratamento com EHVB com inibição máxima da ligação de $95,0 \pm 2,2\%$, enquanto a

dexametasona fria, utilizada como controle inibiu a ligação específica da [^3H]-dexametasona em $84,2 \pm 3,3\%$ (Figura 30).

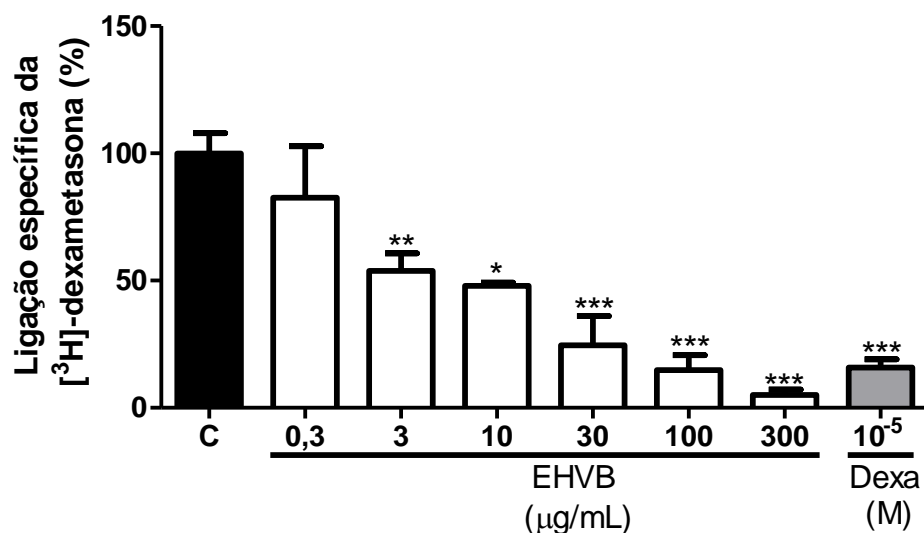


Figura 30. Efeito do EHVB sobre a capacidade de ligação da [^3H]-dexametasona ao receptor de glicocorticoide. O efeito do EHVB sobre a capacidade de ligação da [^3H]-dexametasona ao receptor de glicocorticoide foi avaliada através do “ensaio de troca” em fígado de ratos. As barras verticais representam a média \pm EPM ($n=3$). Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo controle (C). * $P<0,05$, ** $P<0,01$ e *** $P<0,001$.

Desde que os resultados obtidos com o EHVB apontam para um efeito, pelo menos em parte, semelhante ao dos glicocorticoides, tornou-se importante verificar se os efeitos adversos dos glicocorticoides também são promovidos pela administração tópica do EHVB. Um dos efeitos indesejáveis do uso de glicocorticoides por via tópica é a atrofia cutânea assim, um protocolo experimental foi estabelecido para verificar esse parâmetro, onde a espessura da pele das orelhas dos animais foi verificada após tratamento repetido com o EHVB ou dexametasona. A aplicação tópica da dexametasona durante sete dias promoveu alterações na aparência e comportamento dos animais, os quais se tornaram mais letárgicos e com os pelos eriçados, o que não foi observado com a administração de EHVB (parâmetros avaliados subjetivamente através de análise visual). Entretanto, os tratamentos não alteraram o peso corporal dos animais (Figura 31).

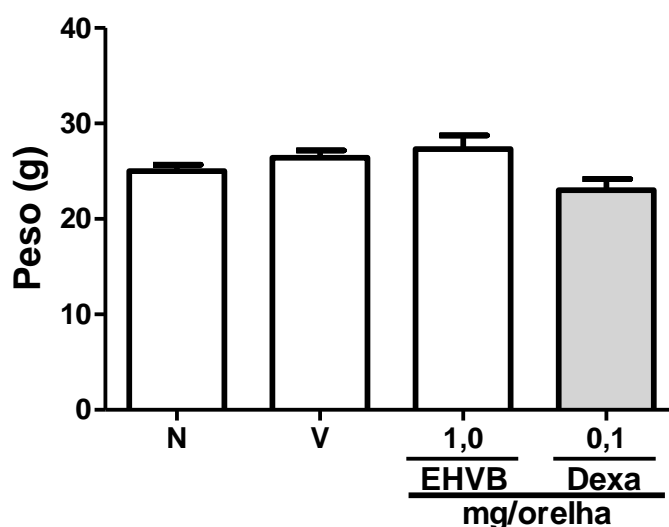


Figura 31. Efeito do EHVB e da dexametasona sobre o peso corporal dos animais. Os animais foram tratados com EHVB (1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha) 12/12 h durante 7 dias. Ao final do tratamento os animais foram pesados. As barras representam a média \pm EPM ($n= 8-14$). (V) representa o grupo que recebeu apenas o veículo (acetona:etanol 1:1) e (N) o grupo naive.

Além disso, aplicação tópica da dexametasona reduziu a espessura das orelhas em aproximadamente $26,7 \pm 2,0 \mu\text{m}$, enquanto o EHVB ou o veículo não promoveram alteração significativa da espessura das orelhas (Figura 32).

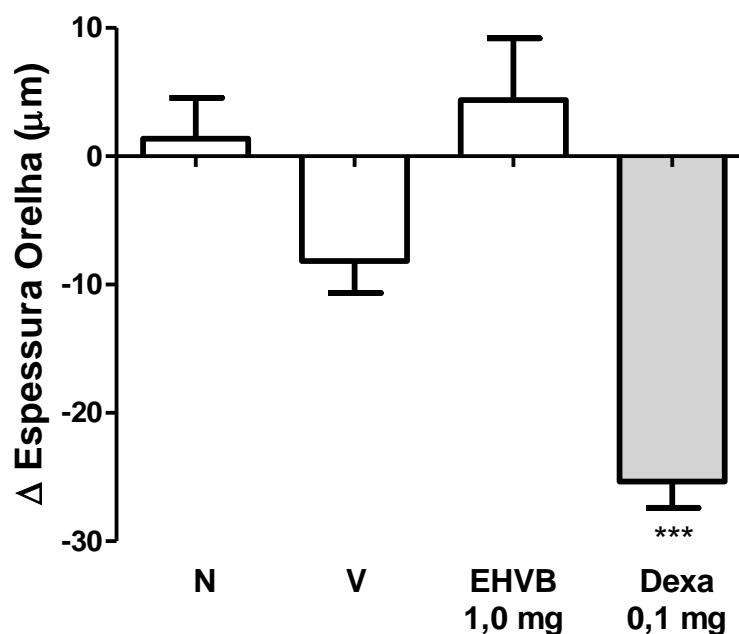


Figura 32. Atrofia cutânea induzida por dexametasona. Os animais foram tratados com EHVB (1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha) 12/12 h durante 7 dias. Ao final do tratamento a espessura das orelhas foi medida com o auxílio de um micrômetro. As barras representam a média \pm EPM ($n= 8-14$) da espessura da orelha. Os símbolos representam o índice de significância quando comparados os grupos tratamento com o grupo naíve (N). *** $P < 0,001$ (V) representa o grupo que recebeu apenas o veículo (acetona:etanol (1:1)).

Para confirmar os efeitos tróficos da dexametasona sobre a pele, após o ensaio de atrofia cutânea, amostras de pele foram submetidas à análise histológica com coloração de tricrômio de Masson o qual evidencia a derme, uma vez que cora as fibras de colágeno em azul (Figura 33).

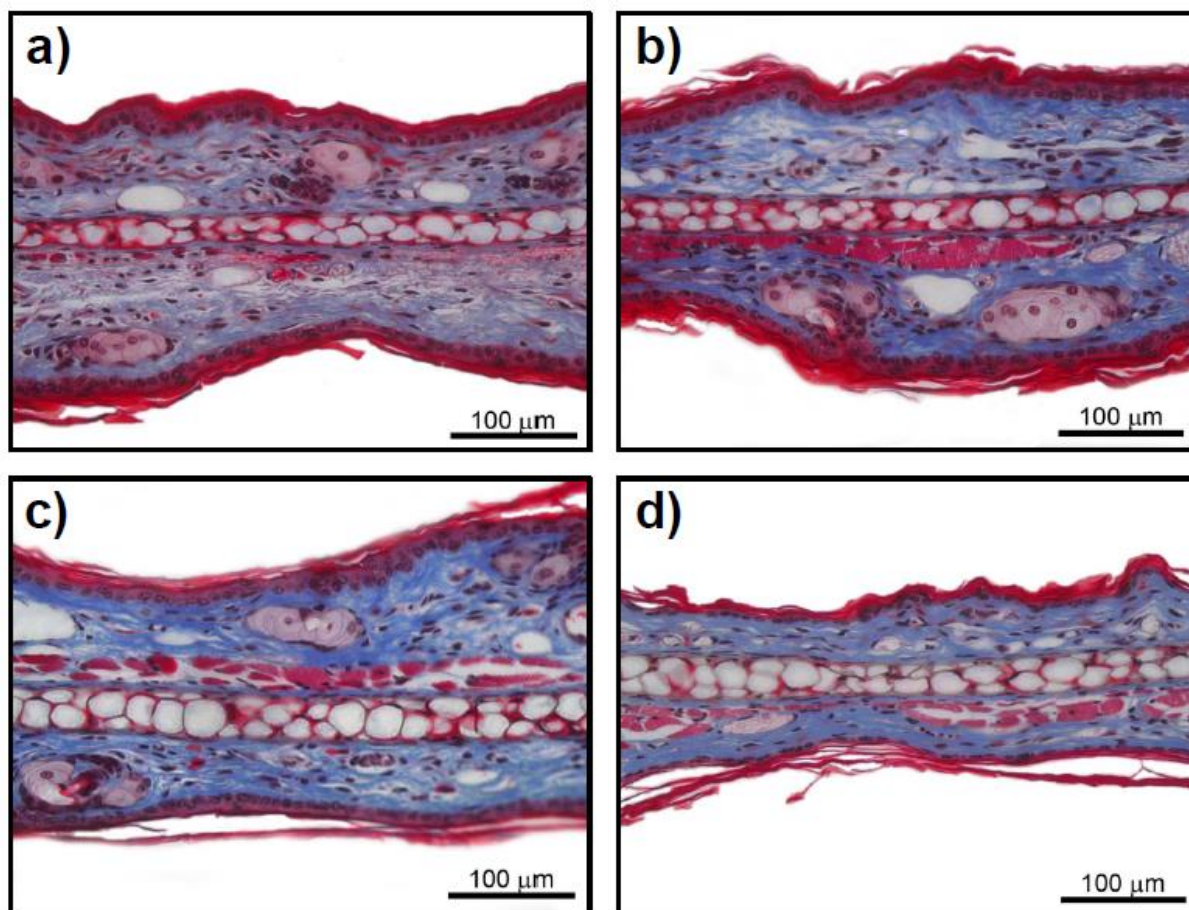


Figura 33. Fotos representativas dos cortes histológicos das orelhas dos camundongos submetidos ao ensaio de atrofia cutânea. Cortes histológicos das orelhas dos camundongos corados com Tricrômio de Masson, aumento de 400x, escala de 100 µm. Sendo representados, o grupo naïve (A), o grupo veículo (B) que recebeu apenas 20 µl de acetona:etanol (1:1)/orelha, os grupos tratados com EHVB (1,0 mg/orelha) (C) ou dexametasona (0,1 mg/orelha) (D).

A medida da espessura da derme demonstrou que o tratamento tópico com dexametasona reduziu a espessura da derme em $17,04 \pm 3,2\%$, enquanto o EHVB não alterou a espessura da derme (Figura 34).

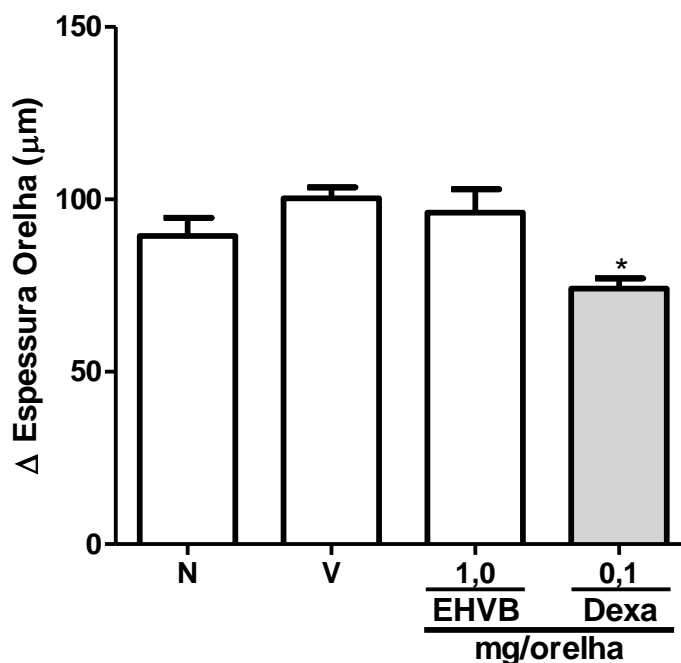


Figura 34. Atrofia da derme induzida pela aplicação de corticoide tópico. Os animais foram tratados com EHVB (1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha) 12/12 h durante 7 dias. Ao final do tratamento a as orelhas foram coletadas e submetidas a análise histológica com coloração de Masson. As barras representam a média \pm EPM ($n= 8-14$) da espessura da derme. Os símbolos representam o índice de significância quando comparados ao grupo naíve (N). * $P<0,05$. (V) representa o grupo que recebeu apenas o veículo (acetona:etanol (1:1)).

Além dos efeitos sobre a pele, a aplicação tópica de glicocorticoides pode promover efeitos sistêmicos. Para verificar a toxicidade sistêmica do EHVB e da dexametasona quando aplicados por via tópica, os animais submetidos ao ensaio de atrofia cutânea foram eutanasiados e as adrenais, o baço e o timo foram coletados e pesados (Figura 35). A aplicação de dexametasona reduziu o peso dos órgãos, em $45,8 \pm 5,9\%$, $63,3 \pm 4,0\%$ e $59,9 \pm 7,4\%$ para adrenais (Figura 36), baço (Figura 37) e timo (Figura 38) respectivamente. O EHVB não promoveu alteração do peso dos órgãos avaliados.

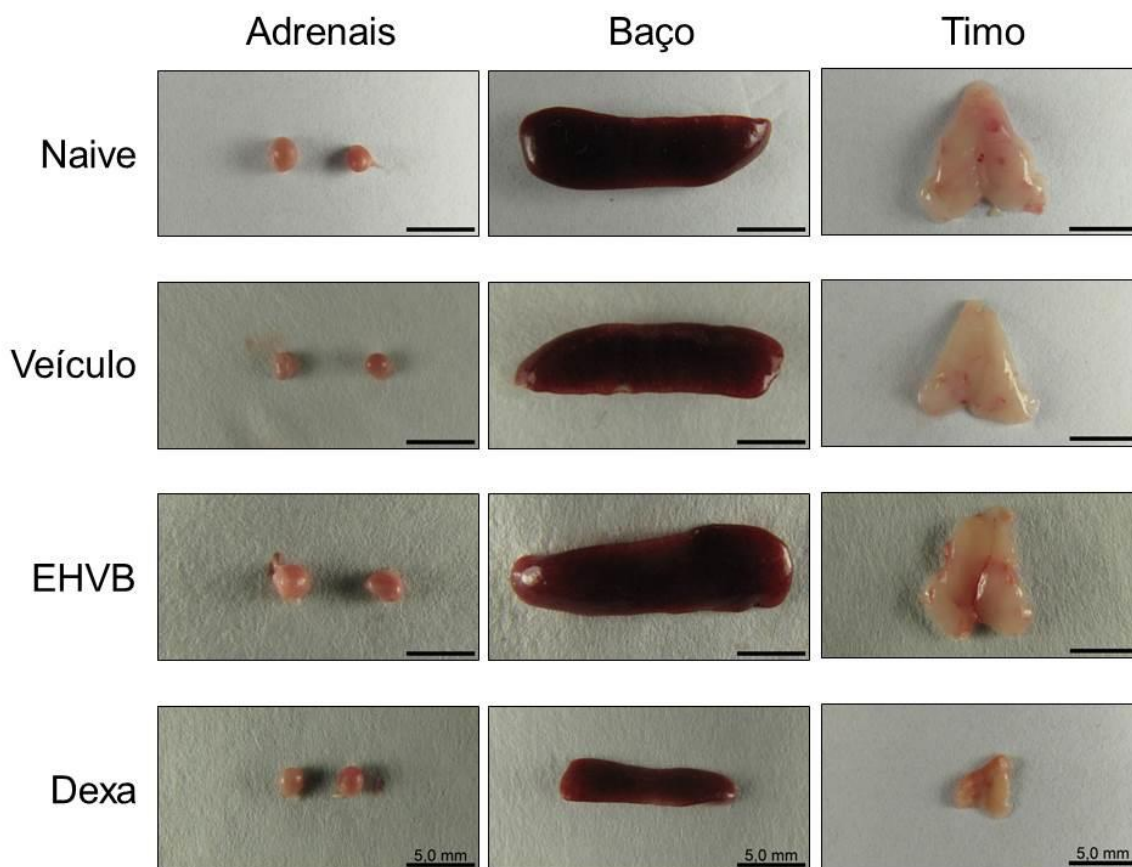


Figura 35. Fotos representativas das adrenais, baço e timo de animais tratados com EHVB ou dexametasona. Os animais foram tratados com EHVB (1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha) 12/12 h durante 7 dias. Escala: 5 mm.

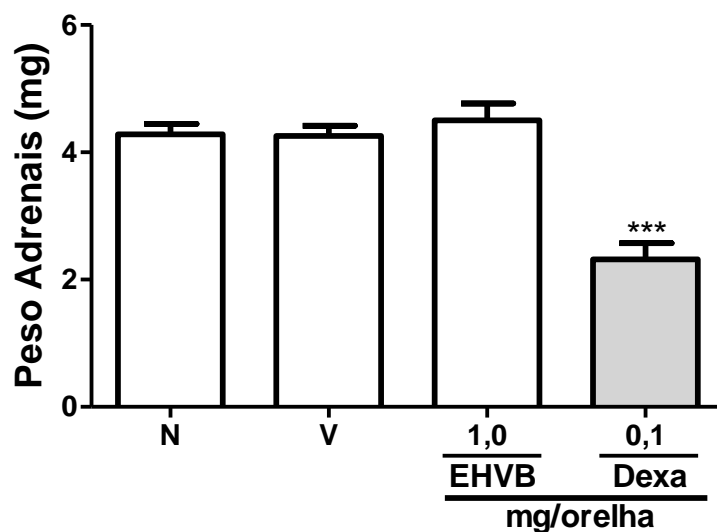


Figura 36. Efeito do EHVB e da dexametasona sobre o peso das adrenais. Os animais foram tratados com EHVB (1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha) 12/12 h durante 7 dias. Ao final do tratamento os animais foram eutanasiados e as adrenais coletadas e pesadas. As barras representam a média \pm EPM (n= 7-11). Os símbolos representam o índice de significância quando comparados os grupos tratamento com o grupo naivo (N). *** $P < 0,001$. (V) representa o grupo que recebeu apenas o veículo (acetona:etanol (1:1)).

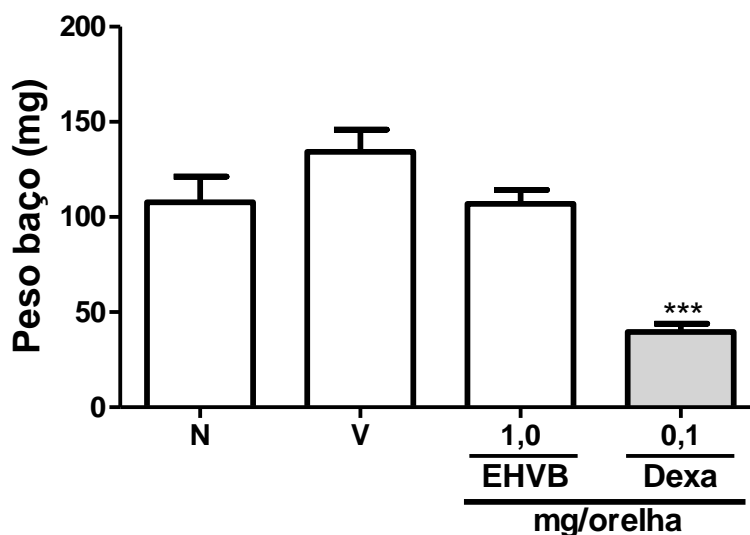


Figura 37. Efeito do EHVB e da dexametasona sobre o peso do baço. Os animais foram tratados com EHVB (1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha) 12/12 h durante 7 dias. Ao final do tratamento os animais foram eutanasiados e o baço coletado e pesado. As barras representam a média \pm EPM (n= 8-14). Os símbolos representam o índice de significância quando comparados os grupos tratamento com o grupo naivo (N). *** $P < 0,001$. (V) representa o grupo que recebeu apenas o veículo (acetona:etanol (1:1)).

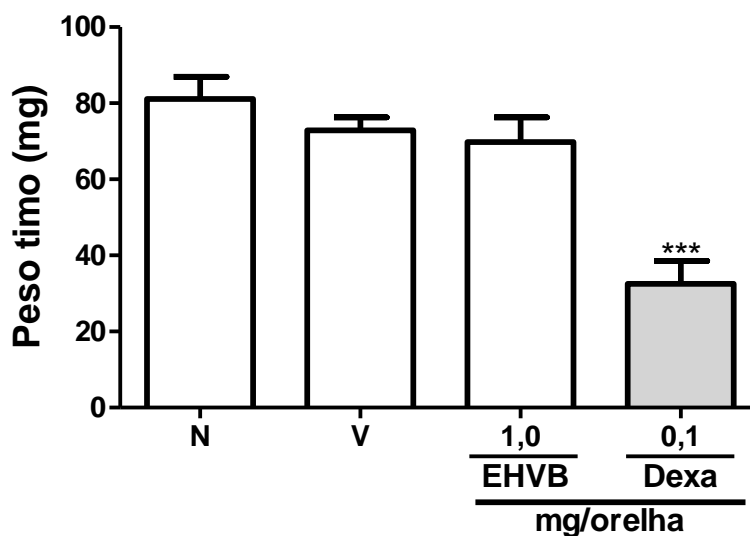


Figura 38. Efeito do EHVB e da dexametasona sobre o peso do timo. Os animais foram tratados com EHVB (1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha) 12/12 h durante 7 dias. Ao final do tratamento os animais foram eutanasiados e o timo coletado e pesado. As barras representam a média \pm EPM (n= 6-7). Os símbolos representam o índice de significância quando comparados os grupos tratamento com o grupo naíve (N). *** $P < 0,001$. (V) representa o grupo que recebeu apenas o veículo (acetona:etanol (1:1)).

Quando aplicados sobre pele não íntegra, os glicocorticoides promovem um atraso no processo de reparação da pele, sendo que o prejuízo da cicatrização é considerado um dos efeitos colaterais cutâneos mais importantes dos glicocorticoides tópicos. Conforme observado na figura 39 o tratamento com EHVB não promoveu alterações no processo de cicatrização quando comparado com o grupo controle, o qual foi tratado apenas com creme base não-iônico. Por outro lado, o tratamento com o fármaco de referência, dexametasona, impediu o processo de cicatrização, sendo que no último dia de experimento, enquanto o grupo veículo e o grupo EHVB apresentavam $10,1 \pm 1,7\%$ e $13,8 \pm 2,1\%$ da área total da ferida, respectivamente, o grupo dexametasona continuava apresentando $45,7 \pm 3,7\%$ da área total da lesão (Figura 40).

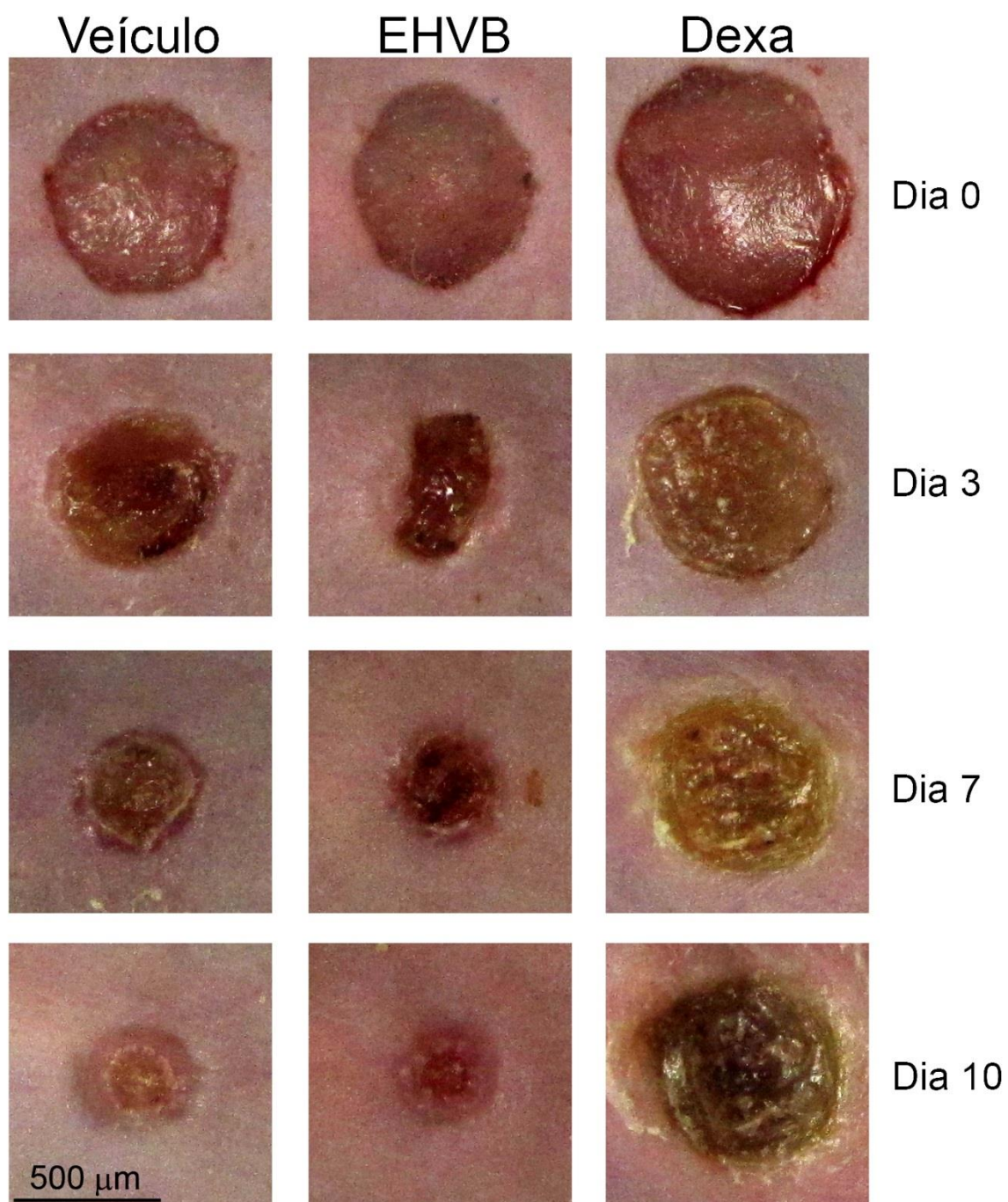


Figura 39. Efeito do EHVB e dexametasona na cicatrização de lesão por excisão. Fotos representativas da excisão nos dias 0, 3, 7 e 10 nos animais tratados com veículo (creme não iônico), EHVB (5%) e Dexametasona (0,1%).

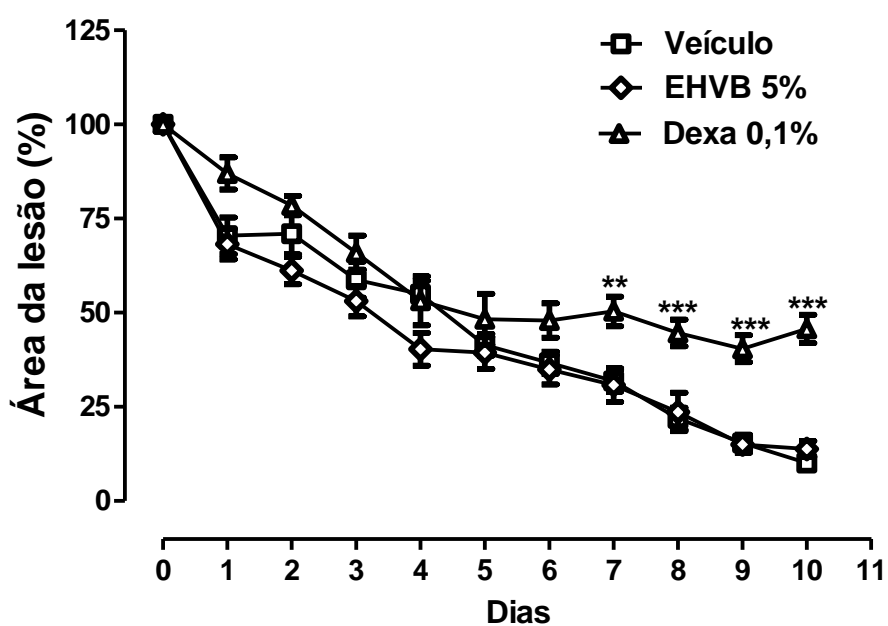


Figura 40. Efeito do EHVB e da dexametasona aplicados por via tópica no modelo de cicatrização por excisão. Os tratamentos foram aplicados diariamente, duas vezes ao dia durante 10 dias após a excisão. A área da lesão foi avaliada a cada 24 horas. Os pontos representam a média \pm EPM. (n = 9). Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo veículo (creme base não iônico) (V). ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

7 DISCUSSÃO

A flora brasileira, com sua ampla e incomparável biodiversidade, representa uma das mais ricas fontes de substâncias biologicamente ativas. Somado à biodiversidade, o Brasil conta também com um afortunado saber tradicional que o coloca em posição privilegiada no desenvolvimento de novos medicamentos derivados de produtos vegetais. Entretanto, muitas plantas medicinais nativas são levadas daqui e estudadas fora do país, sendo comum que produtos derivados dessas plantas sejam patenteados e incorporados no mercado externo de fitoterápicos, principalmente de países desenvolvidos. Muitas vezes, essas plantas, as quais são exploradas no exterior de maneira próspera, não chegam a ser empregadas na fitoterapia brasileira, fato que ressalta o escasso aproveitamento da flora nativa pela indústria nacional (BRANDÃO et al., 2010). Reconhecendo a importância e grandeza da flora brasileira, o governo tem implementado políticas que incentivam o investimento na pesquisa de plantas nativas. Os benefícios da exploração de plantas nativas, vão além do desenvolvimento de fitoterápicos nacionais, uma vez que a promoção do uso sustentável da biodiversidade motiva o aperfeiçoamento da cadeia produtiva desses produtos levando ao beneficiamento socioeconômico no geral (BRASIL, 2009).

Nesse contexto, a exploração da *V. bifalcata* torna-se extremamente promissora, visto que se trata de uma árvore encontrada naturalmente na mata atlântica, onde é explorada pela população nativa, fazendo parte do legado cultural e representando um importante componente socioeconômico. O principal recurso extraído dessa espécie é a madeira, a qual é bastante apreciada na marcenaria local (NEGRELLE et al., 2007). Assim, considerar a espécie como fonte de desenvolvimento de um novo fitoterápico a partir de suas folhas, amplia o aproveitamento da espécie elevando o seu valor econômico.

Atualmente, é impossível falar de extrativismo sem pensar no termo sustentabilidade. Durante muito tempo, os recursos naturais foram explorados sem que houvesse a consciência de que os mesmos são finitos. A destruição massiva de grande parte da mata atlântica fez com que várias espécies, inclusive com potencial medicinal, fossem ameaçadas de extinção. Portanto, ao considerar uma espécie como fonte de fitoterápico, deve-se também avaliar a possibilidade de realizar o

extrativismo sustentável e consciente. Esse fator é especialmente importante para espécies nativas as quais normalmente são extraídas diretamente da natureza, ao contrário de espécies introduzidas que em sua grande maioria são cultivadas. Considerar o cultivo de plantas medicinais, mesmo as nativas, garante a disponibilidade e qualidade do material vegetal empregado na produção de fitoterápicos além de conservar a biodiversidade natural (BRANDAO et al., 2013; CORDELL, 2011).

Mais uma vez *V. bifalcata* apresenta-se como uma espécie promissora para a exploração de seu potencial medicinal uma vez que é uma espécie propícia de ser cultivada. *V. bifalcata* tem caráter dominante, apresenta crescimento rápido e por isso é bastante utilizada no reflorestamento de áreas degradadas. Além disso, o aprimoramento de técnicas para o cultivo dessa espécie vem sendo extensivamente estudado (DANNER et al., 2010). Essas características possibilitam, portanto, considerar o cultivo de *V. bifalcata* para a extração das folhas que podem ser empregadas como droga vegetal no desenvolvimento de formulações fitoterápicas.

Embora algumas espécies do gênero *Vochysia* apresentem atividades farmacológicas comprovadas, não há na literatura relatos sobre qualquer atividade biológica de *V. bifalcata*. Tendo como base estudos que atribuem atividade anti-inflamatória, antioxidante e analgésica a espécies do gênero *Vochysia* (BORTALANZA et al., 2002; GOMES RDE et al., 2009; WENIGER et al., 2005), o presente trabalho buscou verificar a possível atividade anti-inflamatória do extrato bruto das folhas de *V. bifalcata*. Gratificadamente, os resultados demonstram que *V. bifalcata*, apresenta atividade farmacológica marcante, reduzindo de maneira eficaz parâmetros inflamatórios em modelos de inflamação cutânea, agudo e crônico, fato que a qualifica como uma espécie promissora como fonte de um novo agente anti-inflamatório.

Muitos pacientes que sofrem com doenças inflamatórias crônicas da pele são constantemente prejudicados pela ausência de terapias que sejam eficazes e seguras. Atualmente, grande parte do arsenal terapêutico disponível não é plenamente efetiva ou promove uma série de efeitos adversos que inviabilizam seu uso, o que acontece, por exemplo, com muitos pacientes com psoríase. Essa ausência de terapias que sejam satisfatoriamente eficazes e seguras é tão impactante que incentiva pesquisadores e a indústria farmacêutica a buscarem por novas alternativas de tratamento para o controle das condições inflamatórias da pele

(GARCIA-PEREZ; JEAN; POULIOT, 2012). E nessa busca por novas substâncias que possam caracterizar agentes anti-inflamatórios tópicos, muitas substâncias são testadas em ensaios pré-clínicos através de modelos animais que mimetizam as condições inflamatórias da pele observadas na clínica. Entre esses modelos, o edema de orelha é amplamente utilizado, por permitir de maneira prática e rápida a identificação de agentes anti-inflamatórios que possam ser usados por via tópica podendo assim ser considerados para o tratamento de doenças cutâneas (GÀBOR, 2000).

Nesse trabalho, a atividade anti-inflamatória do EHVB foi avaliada principalmente através do modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton ou pelo TPA. O óleo de cróton é uma mistura de ésteres de forbol, extraída da espécie *Croton tiglium* L. (Euphorbiaceae) a qual é conhecida por sua atividade flogística. O TPA é o principal éster de forbol encontrado no óleo de cróton, e ambos quando aplicados na pele promovem um rápido e potente efeito irritante. A reação inflamatória é desencadeada pela ativação da proteína quinase C a qual promove a ativação da fosfolipase A₂ (PLA₂) propiciando o aumento nos níveis de ácido araquidônico e consequente síntese de seus metabólitos, como prostaglandinas (PG) e leucotrienos (LT). Além dos prostanóides, a secreção e ativação de diversos mediadores imunológicos como citocinas e quimiocinas leva a formação dos parâmetros inflamatórios clássicos caracterizados por vasodilatação, infiltração leucocitária e formação de edema (GABOR, 2003; STANLEY et al., 1991).

O extrato das folhas de *V. bifalcata* reduziu os sinais inflamatórios induzidos pela aplicação de óleo de cróton e TPA, sugerindo que os constituintes do extrato, provavelmente tem a habilidade de interferir com moléculas inflamatórias induzidas por esses agentes flogísticos, destacando a possibilidade do desenvolvimento de um novo fitoterápico anti-inflamatório a partir do EHVB.

Considerando o processo inflamatório na pele, em doenças inflamatórias cutâneas, a presença de um intenso infiltrado leucocitário é bastante marcante como a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos. Os polimorfonucleares, também conhecidos como neutrófilos tem ação primordial na resposta inflamatória aguda, possuindo, para tanto, uma maquinaria especializada capaz de degradar proteínas reconhecidas como estranhas. Esse sistema de defesa é caracterizado principalmente por uma grande concentração de espécies reativas de oxigênio

(ERO) que são nocivas contra os patógenos, mas que também podem causar dano ao tecido hospedeiro (NEMETH; MOCSAI, 2012).

Além da participação essencial nos processos inflamatórios agudos, os neutrófilos também fazem parte da patogenia de algumas doenças inflamatórias crônicas, como na psoríase a qual é marcada por um acúmulo excessivo de neutrófilos na pele acometida. Nesses casos, essas células participam da manutenção do ciclo da doença ao interagir com demais células do tecido através da liberação de mediadores inflamatórios como citocinas, ERO e enzimas proteolíticas (TERUI; OZAWA; TAGAMI, 2000). Assim, substâncias que tenham a capacidade de impedir a infiltração de neutrófilos para o foco inflamatório, são consideradas potenciais ferramentas terapêuticas para o tratamento de processos inflamatórios exacerbados. De acordo com nossos resultados, o EHVB foi capaz de reduzir a infiltração de polimorfonucleares para o tecido como evidenciado pela inibição da atividade da enzima MPO e confirmado através de análises histológicas.

A aplicação tópica do EHVB também demonstrou eficaz atividade anti-inflamatória ao reduzir os níveis teciduais das citocinas TNF- α e IL-6, as quais são consideradas mediadores inflamatórios primários, de extrema importância para o estabelecimento e a manutenção da resposta inflamatória (SABAT et al., 2007). O TNF- α é um dos primeiros mediadores pró-inflamatórios liberados frente a um estímulo nocivo, e sua atividade está diretamente relacionada com a ativação de diversas cascatas de sinalização que irão desencadear respostas celulares relacionadas à proliferação, migração, diferenciação, sobrevivência e morte celular. Os principais efeitos da liberação de TNF- α envolvem respostas pró-inflamatórias que culminam em mudanças vasculares e na ativação de leucócitos (BRADLEY, 2008).

Considerada, senão a mais, uma das mais potentes citocinas pró-inflamatórias, o TNF- α é sintetizado e liberado principalmente por macrófagos e linfócitos T, mas diversos outros tipos celulares são capazes de produzi-lo, como neutrófilos e também células cutâneas como os queratinócitos e fibroblastos. Normalmente, essas células não guardam reservas de TNF- α , mas sua expressão é rapidamente induzida na presença de estímulos como o lipopolissacarídeo de membrana de bactérias (LPS), o qual representa o principal promotor da expressão de TNF- α , mas também por estímulo de diversas citocinas como IL-1, interferona (INF)- γ e o próprio TNF- α (BASHIR; SHARMA; WERTH, 2009).

Uma vez que esteja disponível, essa citocina ativa diversas vias de sinalização intracelulares, incluindo a ativação das proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPK) e de fatores de transcrição, principalmente o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e a proteína ativadora (AP)-1. Assim, o TNF- α induz a expressão de diversas proteínas e mediadores inflamatórios que são então os responsáveis pelos sinais desencadeados pela atividade dessa citocina. Analisando os sinais inflamatórios promovidos, primeiramente o TNF- α gera vasodilatação por induzir a expressão das enzimas óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e ciclooxigenase (COX)-2, as quais são responsáveis pela síntese de potentes vasodilatadores, o óxido nítrico (NO) e a PGI₂, respectivamente. Essa citocina promove ainda o aumento da permeabilidade vascular, ao desestabilizar a estrutura do endotélio, por exemplo, ao induzir a desfosforilação da proteína adesiva caderina, a qual é responsável pelas junções celulares endoteliais. O TNF- α aumenta ainda a expressão de moléculas de adesão como E-selectina, P-selectina, molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e molécula de adesão de células vasculares-1 (VCAM-1), facilitando o recrutamento de células inflamatórias para o tecido. Além do mais, síntese de ERO também é aumentada pelo TNF- α uma vez que este induz a expressão de enzimas responsáveis por catalisar a formação desses radicais, como a NADPH oxidase 4A (ZELOVA; HOSEK, 2013).

A participação do TNF- α em respostas inflamatórias é essencial, tanto que sua presença tem sido relacionada com o mecanismo de diversas doenças inflamatórias. Sendo assim, a indústria farmacêutica há algum tempo vem considerando essa molécula como um alvo em potencial para o desenvolvimento de novos fármacos e atualmente existem diversos bloqueadores de TNF- α disponíveis para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas. Entre esses medicamentos podemos citar o infliximab, um anticorpo anti-TNF que quando aplicado adequadamente tem demonstrado eficácia satisfatória no tratamento de distúrbios inflamatórios como a psoríase (LANGLEY, 2012; SARACENO et al., 2012).

Um estímulo nocivo, rapidamente gera também a indução da expressão e liberação de IL-6. Essa citocina atua de maneira sinérgica com o TNF- α desencadeando uma resposta inflamatória aguda. IL-6 é conhecida por ser liberada principalmente por células T e por ativar células B. Entretanto, sua atuação é bem mais ampla, sendo que além de linfócitos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e células inflamatórias não linfoides são capazes de sintetizar e liberar

essa citocina (PAQUET; PIERARD, 1996). A IL-6 participa ativamente da regulação endógena de diversos processos fisiológicos, como a resposta de defesa do organismo, sendo capaz de induzir rapidamente a expressão de proteína de fase aguda no fígado, além da resposta inflamatória e dos processos hematopoiéticos. IL-6 induz a proliferação e a diferenciação de células mielóides, a maturação de linfócitos B com consequente liberação de imunoglobulinas, e a ativação e diferenciação de linfócitos T. Induz ainda, a expressão do VEGF aumentando também o processo de neoangiogênese (ATAIE-KACHOIE; POURGHOLAMI; MORRIS, 2013).

Os efeitos da IL-6 são mediados por três vias de transdução de sinal principais. Primeiramente a ativação de seu receptor promove a fosforilação de quinases da família da Janus quinase (JAK), as quais fosforilam, por conseguinte, transdutor de sinal e ativador de transcrição-3 (STAT3) que leva a expressão gênica de proteínas relacionadas com o crescimento, diferenciação e sobrevivência celular. Durante a ativação do receptor de IL-6 ocorre também a ativação da proteína Ras, a qual uma vez ativada desencadeia a ativação da cascata de fosforilação das MAPK. E por fim, a terceira via de sinalização envolve a ativação de fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), que por sua vez fosforila Akt quinase a qual ativa diversos mediadores da resposta inflamatória como, por exemplo, NF- κ B (ATAIE-KACHOIE et al., 2013).

Na resposta inflamatória, os sinais da IL-6 estão principalmente relacionados com a regulação da infiltração leucocitária, sendo que esse mediador atua como regulador da conversão da resposta imune inata para a resposta imune adaptativa (SCHELLER et al., 2011). Muitos trabalhos têm relacionado distúrbios na atividade normal da IL-6 com a patogênese de doenças inflamatórias crônicas (ISHIHARA; HIRANO, 2002). Pacientes com artrite reumatoide, por exemplo, apresentam elevada expressão de IL-6, e diversas evidências de que o bloqueio da IL-6 diminua os sintomas clínicos da doença tem surgido a partir de ensaios clínicos. Da mesma forma, pacientes asmáticos apresentam altos níveis plasmáticos de IL-6, e ao que tudo indica essa citocina modula a patogênese da doença ao atuar sobre células T induzindo a morte de células T efectoras e ativando as células T regulatórias. A IL-6 parece ainda, ter papel fundamental no desenvolvimento de doenças intestinais crônicas, sendo que estudos clínicos com anticorpos anti-IL-6R tem demonstrado resultados promissores com o controle dos sinais e sintomas da doença (NEURATH;

FINOTTO, 2011). Assim, a indústria farmacêutica tem voltado sua atenção para moléculas capazes de inibir a atividade de IL-6 no desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de doenças inflamatórias (JONES; SCHELLER; ROSE-JOHN, 2011). Recentemente, foi aprovado para uso clínico o primeiro anticorpo anti-IL-6, o Tocilizumab, o qual já vem sendo empregado com sucesso no tratamento da artrite reumatoide (KAUFMANN et al., 2013).

De maneira semelhante à administração tópica, quando administrado por via oral o EHVB manteve seu efeito anti-inflamatório ao inibir a formação de edema e a migração leucocitária. Essa característica amplia as possibilidades de aproveitamento da espécie na produção de um novo fitoterápico, uma vez que para doenças inflamatórias cutâneas complexas, como a psoríase, nem sempre apenas a terapia tópica é suficiente sendo necessária a intervenção com medicamentos de ação sistêmica. Na psoríase, a terapia sistêmica com agentes biológicos ou convencionais, é normalmente selecionada para casos mais graves como de psoríase severa, psoríase pustular, psoríase eritrodérmica e artrite psoriática, ou quando o tratamento tópico e a fototerapia não surtem o efeito desejado. Além disso, alguns pacientes mesmo com sinais cutâneos mais leves, mas com comprometimento considerável do sistema psicossocial, preferem a terapia sistêmica, pois se sentem melhor amparados e acreditam que o tratamento sistêmico esteja aumentando o controle da doença (KANWAR; YADAV; DOGRA, 2010).

Além do modelo de edema de orelha induzido por ésteres de forbol, a aplicação tópica do fenol também foi utilizada como modelo de dermatite de contato irritativa. Os dados obtidos frente a esse modelo são de grande importância uma vez que o fenol mimetiza reações cutâneas que frequentemente ocorrem com a exposição a diferentes agentes irritantes no dia a dia. Os compostos fenólicos são responsáveis pelos efeitos tóxicos cutâneos de dermatites desencadeadas pelo contato da pele com substâncias como tintas, resinas, cosméticos e medicamentos (MURRAY et al., 2007). Apesar do mecanismo pelo qual o fenol promove dano tecidual não estar totalmente elucidado, a rápida irritação cutânea e massiva formação de edema parece ser desencadeada pelo dano direto sobre a membrana dos queratinócitos epidérmicos levando a liberação de mediadores pré-formados, como a IL-1 α . Entretanto, o principal mediador da manutenção da resposta inflamatória nesse caso parece ser o estresse oxidativo estabelecido pela oxidação

do fenol, ou compostos fenólicos, pela ação de diversas enzimas teciduais. Peroxidases, tirosinases e prostaglandina H sintases atuam sobre a molécula do fenol, promovendo sua oxidação em um radical fenoxil. O radical fenoxil, apesar de ser menos reativo que outros radicais, é instável e interage com componentes teciduais levando à toxicidade cutânea. Esse efeito é agravado através da ação dos tióis presentes na pele, que como componentes do mecanismo de defesa antioxidante, reduzem os radicais fenoxil recuperando os compostos fenólicos, os quais ficam expostos à ação das enzimas teciduais novamente, estabelecendo assim um ciclo redox que sustenta a continuada formação de radicais livres (MURRAY et al., 2007; WILMER et al., 1994). Nem todos os agentes anti-inflamatórios que revertem os parâmetros inflamatórios induzidos por ésteres de forbol, são capazes de impedir a resposta inflamatória do fenol, isso porque os mecanismos inflamatórios são distintos (LIM et al., 2004). Desta maneira, os mecanismos pelos quais o EHVB exerce sua atividade anti-inflamatória parecem ser amplos uma vez que a aplicação tópica do EHVB foi bastante eficaz em reduzir a resposta inflamatória desencadeada por ambos agentes flogísticos.

Outra característica interessante da aplicação cutânea do EHVB foi a capacidade em reverter a resposta inflamatória já pré-estabelecida, como observado no modelo de inflamação de pele crônico. Os protocolos terapêuticos de doenças inflamatórias de pele crônicas são normalmente estabelecidos com base na severidade do quadro clínico, avaliando-se os sinais e sintomas da doença. Portanto, o tratamento desses distúrbios visa o controle dos sintomas já estabelecidos, sendo raros os casos em que medicamentos são administrados de maneira profilática (FELDMAN et al., 2005). A aplicação repetida de óleo de cróton promove uma resposta com parâmetros inflamatórios semelhantes aos observados em doenças inflamatórias crônicas, caracterizados por formação de edema e infiltrado inflamatório intenso marcado pela presença principalmente de células mononucleares (STANLEY et al., 1991). A eficácia do EHVB nesse modelo destaca a possibilidade do uso desse extrato como um fitoterápico anti-inflamatório no tratamento de doenças de pele, onde normalmente as terapias são estabelecidas após o aparecimento dos sintomas.

Assim como no modelo agudo, o EHVB também inibiu a migração de leucócitos para o foco inflamatório mesmo quando estimulada de maneira persistente. O infiltrado leucocitário de processos inflamatórios crônicos é

caracterizado principalmente por células mononucleares, como por exemplo, por macrófagos, células abundantemente encontradas nesses casos. Os macrófagos são os responsáveis clássicos pela limpeza do tecido inflamado ao realizar a fagocitose de restos celulares, mas são também capazes de sintetizar e liberar uma gama de citocinas e ERO. Os macrófagos são ainda considerados iniciadores da resolução do processo inflamatório uma vez que liberam citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β (DUFFIELD, 2003). Apesar da diversidade e dualidade de suas atividades, é bem aceito que essas células tem envolvimento direto na inflamação cutânea, participando ativamente da patogênese de distúrbios crônicos como a psoríase, na qual é sabido haver uma importante participação dos macrófagos no início e manutenção das lesões psoriáticas (NICKOLOFF; QIN; NESTLE, 2007). Ao inibir a migração de células mononucleares, como evidenciado pela inibição da atividade da enzima NAG, o EHVB demonstra mais um valioso efeito anti-inflamatório que contribui para possível utilização do extrato no desenvolvimento de um novo fitoterápico.

Além da resposta inflamatória, a aplicação múltipla de óleo de cróton sobre a pele promove aumento da taxa proliferativa dos queratinócitos da epiderme, tornando essa camada hiperproliferativa, o que faz desse modelo uma ferramenta eficaz na pesquisa de substâncias com propriedades antiproliferativas (STANLEY et al., 1991). Em uma pele saudável o tempo necessário para que um queratinócito migre da camada basal para as camadas adjacentes, dura em torno de 26 dias. Mas as doenças hiperproliferativas cutâneas são marcadas pela drástica aceleração da taxa mitótica das células epidérmicas, sendo que na psoríase esse tempo de renovação celular é diminuído para aproximadamente quatro dias (DAS; JAIN; RAMESH, 2009). As alterações histopatológicas que caracterizam as placas psoriáticas envolvem o principalmente o espessamento da epiderme com formação de invaginações que invadem a derme, as quais são chamadas de acantoses. Esse espessamento é causado pelo desequilíbrio na proliferação dos queratinócitos, os quais na epiderme psoriática, são encontrados em estado proliferativo em diversas camadas e não apenas na camada basal. Sendo essas as alterações responsáveis pelo carácter descamativo das lesões cutâneas da psoríase (SCHON; BOEHNCKE, 2005).

Considerando a importância da hiperplasia epidérmica para o estabelecimento das lesões características da doença, substâncias, capazes de

impedir a proliferação de queratinócitos e normalizar a taxa proliferativa epidérmica, tem atraído a atenção dos pesquisadores e da indústria farmacêutica como protótipos de novos medicamentos úteis no tratamento da psoríase (TREMEZAYGUES; REICHRATH, 2011). O tratamento tópico com EHVB promoveu a remissão do espessamento da epiderme induzido pelo óleo de cróton. Esse efeito antiproliferativo do EHVB foi confirmado através da análise imunohistoquímica, onde o extrato diminuiu a expressão de PCNA, um marcador de proliferação celular, nos queratinócitos da pele dos camundongos. O PCNA é um cofator essencial para a replicação gênica, o qual se posiciona ao redor da fita de DNA orientando a atividade da DNA polimerase. A expressão dessa proteína é aumentada durante a proliferação celular, tendo máxima expressão nas fases G1 tardia e S do ciclo celular (MOLDOVAN; PFANDER; JENTSCH, 2007). A atividade antiproliferativa de diversos agentes antipsoriáticos é alcançada através da capacidade de inibir a expressão do PCNA, promovendo assim o controle da proliferação dos queratinócitos. Nesse contexto, a marcação do PCNA é utilizada constantemente como ferramenta de identificação de substâncias com potencial antiproliferativo (LIN et al., 2009). Ao reduzir a expressão de PCNA na epiderme da pele de camundongos, o EHVB demonstra mais uma atividade potencial para o desenvolvimento de um novo fitoterápico. Associado aos efeitos anti-inflamatórios já descritos nesse trabalho, o efeito antiproliferativo abre margens para a possibilidade do emprego do EHVB como ferramenta terapêutica no tratamento da psoríase e outros distúrbios inflamatórios e hiperproliferativos da pele.

A resposta inflamatória intensa presente nas lesões psoriáticas, representa um importante fator desencadeador da hiperproliferação epidérmica na psoríase, sendo que citocinas pró-inflamatórias presentes na lesão são consideradas potentes indutoras da proliferação de queratinócitos. Apesar da patogênese da psoríase ser bastante complexa e os papéis de células inflamatórias e estruturais se misturarem durante o desenvolvimento e manutenção do quadro patológico, é bem aceito que os queratinócitos são constantemente estimulados por células inflamatórias. Linfócitos T, células dendríticas, macrófagos e neutrófilos participam ativamente do estabelecimento da hiperplasia cutânea. Diversas citocinas produzidas e liberadas por essas células, como IL-1, IL-6 e IFN- γ , são comprovadamente indutoras da proliferação de queratinócitos (TONEL; CONRAD, 2009). Assim, nossos resultados sugerem que o efeito antiproliferativo do EHVB é na verdade decorrente da ação

indireta do extrato através de mecanismos anti-inflamatórios, uma vez que o extrato foi eficaz em conter a hiperproliferação dos queratinócitos no modelo animal onde a proliferação ocorre frente a complexa interação entre mediadores inflamatórios e células teciduais, mas não foi capaz de conter a proliferação de células cultivadas, onde o processo de proliferação ocorre por si só, sem interferência externa.

Durante toda a investigação, o EHVB demonstrou atividade anti-inflamatória bastante considerável e apesar de apresentar potência inferior, na maioria dos experimentos, a eficácia do extrato foi comparável à eficácia do fármaco de referência, o glicocorticoide dexametasona. Poucas plantas medicinais possuem atividade anti-inflamatória que demonstrem efeitos tão expressivos. Assim, tornou-se interessante investigar a possibilidade do extrato estar agindo por mecanismos semelhantes aos exercidos pelos glicocorticoides. Para verificar a possível interação do efeito do extrato com o efeito da dexametasona, baixas doses de ambas as substâncias foram administradas, isoladas ou em associação, no modelo de edema de orelha por TPA. O co-tratamento não foi capaz de potenciar o efeito antiedematogênico observado em cada tratamento isolado, sendo que a associação promoveu apenas um pequeno aumento no efeito observado. De acordo com os conceitos de sinergismo farmacológico, quando dois medicamentos associados promovem a potenciação do efeito quando comparado aos seus efeitos isolados, é bem provável que esses compostos estejam atuando por mecanismos de ação distintos. Entretanto, se a associação não potencializa o efeito, mas demonstra um efeito aditivo, normalmente esses medicamentos estão atuando sobre o mesmo sistema, e possivelmente sobre os mesmos alvos moleculares (SECOLI, 2001). Esse resultado sugere, portanto, que o EHVB esteja atuando por mecanismos semelhantes ao glicocorticoide dexametasona.

Em busca de verificar a possível interação do EHVB com os receptores de glicocorticoides, animais tratados com o extrato ou dexametasona foram pré-tratados com um antagonista do receptor de glicocorticoide, a mifepristona. Esse antagonista compete com o glicocorticoide por seu sítio de ligação com afinidade três vezes maior do que a da dexametasona e até dez vezes maior do que a do cortisol (CASTINETTI; BRUE; CONTE-DEVOLX, 2012). Na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos, a mifepristona é empregada como uma ferramenta farmacológica de eficácia bastante significativa na identificação de tratamentos que atuam através dos receptores de glicocorticoides. Dessa maneira,

ao reverter o efeito anti-inflamatório do EHVB, o pré-tratamento com a mifepristona indica que pelo menos em parte, os efeitos anti-inflamatórios do extrato são mediados através da ativação de receptores de glicocorticoides.

Na tentativa de comprovar a hipótese de que a atividade anti-inflamatória do EHVB poderia envolver os receptores de glicocorticoides, foi realizado o ensaio de ligação específica com [³H]-dexametasona em fígado de ratos. Os resultados demonstraram que a ligação da dexametasona é reduzida pelo tratamento com EHVB. Comprovando, portanto, que os compostos presentes no EHVB interagem diretamente com receptores de glicocorticoides. Essa ligação aos receptores de glicocorticoides justifica, portanto, os efeitos anti-inflamatórios do extrato, uma vez que os glicocorticoides representam os agentes anti-inflamatórios e imunomoduladores mais comumente utilizados e com um valor terapêutico bastante significativo no tratamento de diversos distúrbios inflamatórios e autoimunes. Além disso, medicamentos com atividade corticóide tem demonstrado excelente eficácia quando utilizados na terapia de distúrbios inflamatórios e autoimunes comuns, como asma, artrite reumatoide, colite e psoríase (BUTTGEREIT, 2012).

O detrimento da resposta inflamatória gerada pelos glicocorticoides é decorrente dos efeitos pleiotrópicos dos receptores de glicocorticoides, os quais uma vez ativados interferem com diversas vias de sinalização. Esses receptores atuam principalmente através de efeitos genômicos, quando uma vez ativados promovem alterações em vias de sinalização inflamatórias que levam a ativação ou bloqueio da expressão de diversos genes envolvidos no desenvolvimento da resposta inflamatória (VANDEVYVER et al., 2013). Como exemplos desses efeitos genômicos podemos citar a indução da anexina-1 e da MAPK fosfatase-1, e a repressão da transcrição da COX-2 (RHEN; CIDLOWSKI, 2005).

Quando ativados, os receptores de glicocorticoides migram para o núcleo da célula, onde podem ligar-se a regiões promotoras da expressão do gene que codifica a proteína anexina-1 promovendo assim o aumento de sua expressão. A anexina-1 tem a capacidade de se ligar à PLA₂, impedindo assim a clivagem dos fosfolipídeos de membrana e consequente liberação de ácido araquidônico. Desde que o ácido araquidônico é o precursor dos mediadores inflamatórios eicosanoides, ao bloquear a PLA₂ a anexina-1 proporciona potente efeito anti-inflamatório (RHEN; CIDLOWSKI, 2005). A anexina-1 liga-se ainda ao fator de transcrição NF-κB, o qual

tem papel essencial no processo inflamatório, inibindo sua ação e, portanto, reduzindo os eventos inflamatórios (VANDEVYVER et al., 2013).

A MAPK fosfatase-1 é considerada a mais potente proteína anti-inflamatória induzida por glicocorticoides. Essa fosfatase catalisa a desfosforilação de todas as subfamílias de MAPK impedindo a atividade dessas enzimas. As MAPKs figuram as principais cascatas de sinalização que permitem a transdução de diversos sinais na ativação de fatores de transcrição que culmina com a expressão de uma gama de proteínas inflamatórias. Assim, ao induzir a expressão de MAPK fosfatase-1, os glicocorticoides promovem o bloqueio de um componente essencial da cascata de sinalização de respostas inflamatórias e imunes (AYROLDI et al., 2012).

Uma vez ativado o fator de transcrição NF- κ B migra para o núcleo onde se liga ao DNA em regiões promotoras da transcrição do gene de proteínas inflamatórias como citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas como a COX-2. Um dos mecanismos dos receptores de glicocorticoides envolve a interação direta com o NF- κ B, assim como com outros fatores de transcrição, impedindo a interação desses fatores com o DNA, levando conseqüentemente, à inibição da expressão de diversas proteínas pró-inflamatórias (DE BOSSCHER; VANDEN BERGHE; HAEGEMAN, 2003).

Embora, não seja possível ainda identificar os efeitos moleculares induzidos pela ligação dos compostos do EHVB aos receptores de glicocorticoides, ou demonstrar as vias de ativação do receptor induzidas por essa ligação, muito provavelmente, os efeitos anti-inflamatórios observados pela aplicação do EHVB sejam decorrentes, pelo menos em parte, da ativação desses receptores. Porém, é importante considerar, que por se tratar de um extrato bruto, onde provavelmente diversos componentes estão presentes, esse efeito do tipo corticoide pode ser resultado da atividade de um ou alguns dos componentes do extrato, mas não necessariamente de todos, sendo que outras substâncias podem desempenhar seus efeitos através de outros mecanismos.

Tendo em vista a indiscutível eficácia dos glicocorticoides em reduzir parâmetros inflamatórios, qual é o sentido em buscar e desenvolver novas terapias anti-inflamatórias? Apesar da ampla utilização dos glicocorticoides e do título de mais potente anti-inflamatório atualmente disponível, o uso desses medicamentos tem sido refreado por duas principais desvantagens: o aparecimento de efeitos adversos importantes, e o desenvolvimento de resistência (VANDEVYVER et al.,

2013). Os receptores de glicocorticoides participam de maneira ativa na manutenção da homeostasia do organismo, auxiliando na modulação de diversos sistemas fisiológicos como o sistema ósseo, cardiovascular e metabólico. Deste modo, a introdução de concentrações farmacológicas de glicocorticoides exógenos acaba alterando esses sistemas, outrora tão bem regulados, promovendo diversos efeitos adversos importantes que incluem diabetes, osteoporose, obesidade e hipertensão, entre outros. Dessa maneira, atualmente existe uma grande preocupação em manipular os efeitos pleiotrópicos dos medicamentos com atividade glicocorticoide de forma que conservem sua eficácia, mas tenham os efeitos indesejáveis reduzidos (MCMASTER; RAY, 2007). Além do mais, embora amplamente utilizado durante décadas, os efeitos dos glicocorticoides apresentam variações significativas na responsividade dos pacientes à terapia. Os casos mais comuns são de resistência adquirida, principalmente em pacientes que sofrem de doenças crônicas, onde as alterações do microambiente celular acabam afetando as vias pelas quais o receptor ativado desempenha seus efeitos, impedindo seu funcionamento normal (BARNES; ADCOCK, 2009).

Uma vez comprovada a ligação do EHVB aos receptores de glicocorticoides, tornou-se interessante investigar se assim como os glicocorticoides clássicos, o extrato também poderia desencadear efeitos adversos. Desde que o foco desse trabalho foi a utilização do extrato por via tópica, os possíveis efeitos adversos foram avaliados primeiramente em um ensaio de atrofia cutânea. A atrofia cutânea é o mais importante efeito adverso da terapia corticoide por via tópica. A aplicação repetida do glicocorticoide sobre a pele promove alterações teciduais que causam a desestruturação da barreira cutânea. A lesão típica da atrofia cutânea induzida por glicocorticoide se caracteriza por estrias largas onde a pele é bastante fina, transparente, altamente frágil, tem aparência brilhante e eritematosa, além de ocorrer a formação de telangiectasias e perda de água. Esses sinais são ocasionados por alterações na derme e na epiderme caracterizadas principalmente pela diminuição da espessura das camadas, com redução do tamanho dos queratinócitos e no número de fibroblastos e reorganização das estruturas das camadas. A atrofia cutânea pode ser prevenida com cuidados que incluem a escolha de glicocorticoides com menor potência e a diminuição da duração do tratamento, entretanto uma vez que a atrofia se estabeleça os danos causados na pele são irreversíveis (SCHOEPE et al., 2006). Mas, ao contrário da dexametasona, o EHVB

não demonstrou toxicidade cutânea aparente nos nossos experimentos sugerindo ser relativamente seguro para aplicação tópica.

Outro efeito adverso cutâneo bastante comum com o uso de glicocorticoides é o prejuízo e atraso no processo de reparação da pele. O atraso na cicatrização é observado tanto nas lesões decorrentes da atrofia cutânea estabelecida pela aplicação tópica de glicocorticoide, quanto em lesões adquiridas como feridas cirúrgicas, traumáticas ou ulcerativas (GUILLLOT, 2013). Os mecanismos pelos quais os glicocorticoides promovem o atraso da cicatrização envolvem principalmente a supressão da resposta inflamatória que tem importância crucial na primeira fase da cicatrização. Com a fase inflamatória prejudicada, a ausência de células inflamatórias no tecido impede a ativação apropriada das células estruturais as quais deixam de exercer a reparação tecidual adequada. Além disso, os glicocorticoides suprimem a expressão de diversas moléculas inflamatórias entre citocinas e fatores de crescimento, os quais estão diretamente ligados ao processo de reparação cutânea. Esses medicamentos promovem ainda a supressão da expressão de colágeno, molécula primordial para a formação e manutenção da estrutura dérmica (SCHACKE; DOCKE; ASADULLAH, 2002). Mais uma vez, o EHVB demonstrou considerável segurança para administração cutânea, uma vez que ao ser avaliado num modelo de cicatrização cutânea, não promoveu alterações no processo cicatricial normal.

Mesmo quando administrados por via tópica, os glicocorticoides acabam sendo absorvidos em concentrações significativas, as quais podem ocasionar efeitos adversos sistêmicos, como a supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (NIEMAN, 2011). Podem ocorrer ainda alterações em órgãos que estejam diretamente relacionados aos efeitos fisiológicos dos corticoides, como os órgãos linfóides. No ensaio de atrofia cutânea foi possível avaliar o efeito dos tratamentos sobre o peso da adrenal, do timo e do baço, demonstrando que a dexametasona causou redução do peso de todos esses órgãos enquanto o EHVB não os alterou. A diminuição no peso das adrenais é um indicativo de que esteja ocorrendo a supressão das mesmas, através da retroalimentação negativa do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, causada pelo aumento na concentração de glicocorticoide circulante. Esse efeito é bastante preocupante do ponto de vista da segurança do medicamento, uma vez que muitos dos efeitos adversos dos glicocorticoides surgem como resultado da supressão adrenal, entre eles a própria síndrome de Cushing,

inibição do crescimento, osteoporose e alterações neuropsiquiátricas (SARNES et al., 2011).

Os dois outros órgãos avaliados, timo e baço, são órgãos linfoides e, portanto, uma vez que estejam atrofiados indicam o efeito imunossupressor exacerbado promovido pelo tratamento. A mesma imunossupressão que confere aos glicocorticoides um valor terapêutico inestimável é também responsável pelas constantes infecções oportunistas que acompanham os regimes imunossupressores. Infecções por fungos, bactérias e vírus são constantemente associados ao uso de glicocorticoides sendo as mais comuns a tuberculose, sepse, pneumonia, infecções do trato urinário, herpes zoster, além de micoses e candidíase oral (CUTOLO et al., 2008).

Assim, o EHVB quando administrado em processos inflamatórios da pele em camundongos, demonstrou atividade anti-inflamatória bastante evidente, sem entretanto promover os mesmos efeitos adversos causados pela dexametasona, um glicocorticoide utilizado como fármaco de referência. Esses resultados conferem às folhas da *V. bifalcata* um grande potencial como possível fonte de droga vegetal para o desenvolvimento de um fitoterápico anti-inflamatório de uso tópico.

Muitas espécies arbóreas são cultivadas no Brasil de maneira bem sucedida, como é o caso do eucalipto, o qual apresenta cadeia produtiva bem estruturada. O eucalipto também representa uma espécie de fácil cultivo, e assim são aproveitados a madeira pela indústria madeireira, e para a produção de papel, e ainda o óleo essencial amplamente empregado na indústria na produção dos mais diversos produtos, como produtos de limpeza, medicamentos e alimentos (ROCHA; SANTOS, 2007). Tendo como exemplo o eucalipto e outras espécies que contribuem grandemente para o crescimento socioeconômico brasileiro, *V. bifalcata* tem grande potencial para ser cultivada e responsavelmente explorada, com a vantagem de ser uma planta nativa.

Vale a pena comentar, que o presente trabalho demonstrou a atividade anti-inflamatória tópica do extrato bruto das folhas de *V. bifalcata* sem, entretanto, demonstrar qualquer princípio ativo isolado desse material. A ausência de um composto isolado não parece ser um problema, uma vez que podemos citar diversas vantagens do desenvolvimento de um medicamento fitoterápico ao invés de um fitofármaco. Inicialmente, o desenvolvimento de um fitoterápico demonstra maior facilidade e pode exigir menor custo quando comparado ao desenvolvimento e

produção de um fármaco puro. A identificação do composto de efeito majoritário em um extrato é muitas vezes complexa, demorada e dispendiosa. Além disso, o composto isolado geralmente é dotado de tamanha complexidade estrutural que acaba dificultando sua síntese, não sendo raros os casos de substâncias que uma vez isoladas tornam-se esquecidas sem, portanto, originar novos fármacos (CALIXTO, JOÃO B., 2003). Adicionalmente, a indústria farmacêutica que durante muito tempo teve como foco o desenvolvimento de moléculas isoladas com alvos específicos, hoje vive uma nova fase onde busca medicamentos multicomponentes. Promovido principalmente pela dificuldade no controle de doenças crônicas as quais são multifatoriais, e muitas vezes refratárias aos fármacos atualmente disponíveis, o novo foco do desenvolvimento de medicamentos visa compostos que atuem em diversos alvos moleculares e possam assim interferir com diferentes mecanismos da doença ao mesmo tempo (TIAN; LIU, 2012).

8 CONCLUSÃO

O EHVB apresenta atividade anti-inflamatória quando aplicado por via tópica em diversos modelos de inflamação cutânea agudos. Sendo que nesses modelos o efeito anti-inflamatório está relacionado à inibição da formação de edema, da migração leucocitária e da síntese de citocinas, não perdendo sua eficácia quando administrado por via oral. Além disso, o EHVB é capaz de reverter o processo inflamatório pré-estabelecido em um modelo de inflamação crônica.

O EHVB apresenta atividade antiproliferativa quando aplicado por via tópica em um modelo de inflamação crônica induzida pela aplicação múltipla de óleo de cróton. Sendo essa atividade evidenciada pela inibição da hiperplasia epidermal e inibição da expressão de PCNA. Entretanto, não demonstra atividade antiproliferativa sobre queratinócitos epidérmicos *in vitro*, o que sugere que o efeito antiproliferativo é resultante da inibição da resposta inflamatória.

O efeito anti-inflamatório do EHVB é mediado, pelo menos em parte, pela ligação à receptores de glicocorticoides. Entretanto, o EHVB não promove alguns efeitos adversos normalmente desencadeados por medicamentos com atividade corticoide, demonstrando assim vantagem sobre os glicocorticoides clássicos.

Enfim, nossos resultados conferem às folhas de *V. bifalcata* a possibilidade de serem utilizadas como fonte de um fitoterápico para o tratamento de doenças de pele inflamatórias e hiperproliferativas. Considerando a importância social, econômica e ecológica dessa espécie, essa estratégia agregaria valor estimável a essa espécie nativa. Resta agora, a necessidade do desenvolvimento de estudos adicionais para a confirmação da eficácia e segurança e ainda para o estabelecimento da formulação farmacêutica satisfatoriamente adequada.

REFERÊNCIAS

AHN, S. K. et al. Effects of a multilamellar emulsion on glucocorticoid-induced epidermal atrophy and barrier impairment. **J Dermatol**, v. 33, n. 2, p. 80-90, Feb 2006.

ANVISA. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Resolução-RDC Nº. 48, de 16 de março de 2004. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, 18 de março de 2004.

ATAIE-KACHOIE, P.; POURGHOLAMI, M. H.; MORRIS, D. L. Inhibition of the IL-6 signaling pathway: a strategy to combat chronic inflammatory diseases and cancer. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 24, n. 2, p. 163-73, Apr 2013.

AYROLDI, E. et al. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. **FASEB J**, v. 26, n. 12, p. 4805-20, Dec 2012.

BARNES, P. J.; ADCOCK, I. M. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. **Lancet**, v. 373, n. 9678, p. 1905-17, May 30 2009.

BASHIR, M. M.; SHARMA, M. R.; WERTH, V. P. TNF-alpha production in the skin. **Arch Dermatol Res**, v. 301, n. 1, p. 87-91, Jan 2009.

BOOKER, A.; JOHNSTON, D.; HEINRICH, M. Value chains of herbal medicines-- research needs and key challenges in the context of ethnopharmacology. **J Ethnopharmacol**, v. 140, n. 3, p. 624-33, Apr 10 2012.

BORTALANZA, L. B. et al. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 453, n. 2-3, p. 203-8, Oct 25 2002.

BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **J Pathol**, v. 214, n. 2, p. 149-60, Jan 2008.

BRANDAO, M. D. et al. Changes in the trade in native medicinal plants in Brazilian public markets. **Environ Monit Assess**, Jan 16 2013.

BRANDÃO, M. D. G. L. et al. BIODIVERSIDADE, USO TRADICIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E PRODUÇÃO DE FITOTERÁPICOS EM MINAS GERAIS. In: (Ed.). **Anais do XIV Seminário sobre a Economia Mineira [Proceedings of the 14th Seminar on the Economy of Minas Gerais]**. Cedeplar, Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

BRASIL. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. D. C., TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS, DEPARTAMENTO DE ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA E INSUMOS ESTRATÉGICOS. Brasília: Ministério da Saúde: 136 p. 2009.

BRASIL. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. Brasília: Ministério da Saúde: 156 p. 2012a.

BRASIL. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais. 2012b. Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/anexos_rename_2012_pt_533_11_06_2012.pdf >. Acesso em: 05 de junho de 2013.

BUCKLE, D. R.; HEDGECOCK, C. J. R. Drug targets in inflammation and immunomodulation. **Drug Discovery Today**, v. 2, n. 8, p. 8, 1997.

BUTTGEREIT, F. A fresh look at glucocorticoids how to use an old ally more effectively. **Bull NYU Hosp Jt Dis**, v. 70 Suppl 1, p. 26-9, 2012.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-89, Feb 2000.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, p. 37-39, 2003.

CANTER, P. H.; THOMAS, H.; ERNST, E. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. **Trends Biotechnol**, v. 23, n. 4, p. 180-5, Apr 2005.

CAPASSO, R. et al. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71 Suppl 1, p. S58-65, Aug 2000.

CARVALHO, A. C. B. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 6, 2008.

CARVALHO, P. E. R. Guaricica (*Vochysia bifalcata*). Colombo-PR, 2008. Disponível em: < <http://www.cnpf.embrapa.br/publica/circtec/edicoes/circ-tec150.pdf> >. Acesso em: 05/05/2013.

CASTINETTI, F.; BRUE, T.; CONTE-DEVOLX, B. The use of the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone in Cushing's syndrome. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 19, n. 4, p. 295-9, Aug 2012.

CORDELL, G. A. Sustainable medicines and global health care. **Planta Med**, v. 77, n. 11, p. 1129-38, Jul 2011.

CORDELL, G. A.; COLVARD, M. D. Natural products and traditional medicine: turning on a paradigm. **J Nat Prod**, v. 75, n. 3, p. 514-25, Mar 23 2012.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, Feb 18 2013.

CUTOLO, M. et al. Use of glucocorticoids and risk of infections. **Autoimmun Rev**, v. 8, n. 2, p. 153-5, Dec 2008.

DANNER, M. A. et al. Estaquia semilenhosa de *Vochysia bifalcata*. **Scientia Agraria**, v. 11, n. 6, p. 5, 2010.

DAS, R. P.; JAIN, A. K.; RAMESH, V. Current concepts in the pathogenesis of psoriasis. **Indian J Dermatol**, v. 54, n. 1, p. 7-12, 2009.

DE BOSSCHER, K.; VANDEN BERGHE, W.; HAEGEMAN, G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. **Endocr Rev**, v. 24, n. 4, p. 488-522, Aug 2003.

DE LUCA, V. et al. Mining the biodiversity of plants: a revolution in the making. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1658-61, Jun 29 2012.

DE YOUNG, L. M. et al. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents and Actions**, v. 26, n. 3-4, p. 335-41, Mar 1989.

DEBENEDICTIS, C. et al. Immune functions of the skin. **Clinics in Dermatology**, v. 19, n. 5, p. 573-85, Sep-Oct 2001.

DENG, S. et al. Topical herbal medicine combined with pharmacotherapy for psoriasis: a systematic review and meta-analysis. **Arch Dermatol Res**, v. 305, n. 3, p. 179-89, Apr 2013.

DENNING, M. F. Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 7, p. 1141-6, Jul 2004.

DUFFIELD, J. S. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. **Clin Sci (Lond)**, v. 104, n. 1, p. 27-38, Jan 2003.

EFFERTH, T.; KOCH, E. Complex interactions between phytochemicals. The multi-target therapeutic concept of phytotherapy. **Curr Drug Targets**, v. 12, n. 1, p. 122-32, Jan 2011.

FELDMAN, S. R. et al. Decision points for the initiation of systemic treatment for psoriasis. **J Am Acad Dermatol**, v. 53, n. 1, p. 101-7, Jul 2005.

FERRANDIZ, C.; CARRASCOSA, J. M.; BOADA, A. A new era in the management of psoriasis? The biologics: facts and controversies. **Clin Dermatol**, v. 28, n. 1, p. 81-7, Jan-Feb 2010.

FERREIRA, Z. S. et al. Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. **J Pineal Res**, v. 38, n. 3, p. 182-8, Apr 2005.

FRANK, S.; KAMPFER, H. Excisional wound healing. An experimental approach. **Methods Mol Med**, v. 78, p. 3-15, 2003.

FREINKEL, R. K.; WOODLEY, D. T. **The Biology of the Skin**. Lancaster: Parthenon, 2001.

GABOR, M. Models of acute inflammation in the ear. **Methods Mol Biol**, v. 225, p. 129-37, 2003.

GÀBOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 2000.

GARCIA-PEREZ, M. E.; JEAN, J.; POULIOT, R. Antipsoriatic drug development: challenges and new emerging therapies. **Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov**, v. 6, n. 1, p. 3-21, Jan 2012.

GARG, V. et al. Facts about standardization of herbal medicine: a review. **Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao**, v. 10, n. 10, p. 1077-83, Oct 2012.

GEORGE, S. E. et al. Evaluation of a range of anti-proliferative assays for the preclinical screening of anti-psoriatic drugs: a comparison of colorimetric and fluorimetric assays with the thymidine incorporation assay. **Assay Drug Dev Technol**, v. 8, n. 3, p. 389-400, Jun 2010.

GILLITZER, R.; GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. **J Leukoc Biol**, v. 69, n. 4, p. 513-21, Apr 2001.

GNIADDECKI, R. Regulation of keratinocyte proliferation. **Gen Pharmacol**, v. 30, n. 5, p. 619-22, May 1998.

GOMES RDE, C. et al. Antioxidative action of methanolic extract and buthanolic fraction of *Vochysia tucanorum* Mart. in the gastroprotection. **J Ethnopharmacol**, v. 121, n. 3, p. 466-71, Jan 30 2009.

GOTTLIEB, O. R. Phytochemicals - Differentiation and Function. **Phytochemistry**, v. 29, n. 6, p. 1715-1724, 1990.

GREAVES, M. W. The immunopharmacology of skin inflammation: the future is already here! **Br J Dermatol**, v. 143, n. 1, p. 47-52, Jul 2000.

GUILLOT, B. [Glucocorticoid-induced cutaneous adverse events]. **Rev Med Interne**, v. 34, n. 5, p. 310-4, May 2013.

HESS, S. C. et al. Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae). **J Ethnopharmacol**, v. 47, n. 2, p. 97-100, Jul 7 1995.

HORINOUCI, C. D. et al. *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae): potential as an antiproliferative and anti-inflammatory agent. **J Ethnopharmacol**, v. 145, n. 1, p. 311-9, Jan 9 2013.

HORINOUCI, C. D. S.; OTUKI, M. F. Botanical Briefs: Comfrey (*Symphytum officinale*). **Cutis**, v. 91, p. 3, May 2013.

ISHIHARA, K.; HIRANO, T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 13, n. 4-5, p. 357-68, Aug-Oct 2002.

JONES, S. A.; SCHELLER, J.; ROSE-JOHN, S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 9, p. 3375-83, Sep 2011.

JOOS, S.; GLASSEN, K.; MUSSELMANN, B. Herbal Medicine in Primary Healthcare in Germany: The Patient's Perspective. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 294638, 2012.

JORDAN, S. A.; CUNNINGHAM, D. G.; MARLES, R. J. Assessment of herbal medicinal products: challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 243, n. 2, p. 198-216, Mar 1 2010.

KALAMI, M.; HUBBARD, J. R. Development of an exchange assay for cytosolic glucocorticoid receptors using the synergistic effects of molybdate plus dithiothreitol. **Endocrinology**, v. 113, p. 3, 1983.

KANWAR, A. J.; YADAV, S.; DOGRA, S. Psoriasis: what is new in nonbiologic systemic therapy in the era of biologics? **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v. 76, n. 6, p. 622-33, Nov-Dec 2010.

KAUFMANN, J. et al. Monotherapy with tocilizumab or TNF-alpha inhibitors in patients with rheumatoid arthritis: efficacy, treatment satisfaction, and persistence in routine clinical practice. **Clin Rheumatol**, May 24 2013.

LANGLEY, R. G. Effective and sustainable biologic treatment of psoriasis: what can we learn from new clinical data? **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 26 Suppl 2, p. 21-9, Mar 2012.

LIM, H.; PARK, H.; KIM, H. P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. **Arch Pharm Res**, v. 27, n. 4, p. 442-8, Apr 2004.

LIN, Y. K. et al. Anti-psoriatic effects of indigo naturalis on the proliferation and differentiation of keratinocytes with indirubin as the active component. **J Dermatol Sci**, v. 54, n. 3, p. 168-74, Jun 2009.

LIU, Y. et al. Whole-tree agarwood-inducing technique: an efficient novel technique for producing high-quality agarwood in cultivated *Aquilaria sinensis* trees. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 3086-106, 2013.

MACNEIL, S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 874-80, Feb 22 2007.

MAHADEVAN, S.; PARK, Y. Multifaceted therapeutic benefits of *Ginkgo biloba* L.: chemistry, efficacy, safety, and uses. **J Food Sci**, v. 73, n. 1, p. R14-9, Jan 2008.

MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C. C. The skin as a mirror of the aging process in the human organism--state of the art and results of the aging research in the German National Genome Research Network 2 (NGFN-2). **Exp Gerontol**, v. 42, n. 9, p. 879-86, Sep 2007.

MAN, M. Q. et al. Chinese herbal medicine (Tuhuai extract) exhibits topical anti-proliferative and anti-inflammatory activity in murine disease models. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 8, p. 681-7, Aug 2008.

MAYWORM, M. A. et al. Nutritional reserves of Vochysiaceae seeds: chemical diversity and potential economic uses. **Anais Da Academia Brasileira De Ciencias**, v. 83, n. 2, p. 523-31, Jun 2011.

MCMMASTER, A.; RAY, D. W. Modelling the glucocorticoid receptor and producing therapeutic agents with anti-inflammatory effects but reduced side-effects. **Exp Physiol**, v. 92, n. 2, p. 299-309, Mar 2007.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **Eur J Med Chem**, v. 46, n. 10, p. 4769-807, Oct 2011.

MOLDOVAN, G. L.; PFANDER, B.; JENTSCH, S. PCNA, the maestro of the replication fork. **Cell**, v. 129, n. 4, p. 665-79, May 18 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

MURRAY, A. R. et al. Phenol-induced in vivo oxidative stress in skin: evidence for enhanced free radical generation, thiol oxidation, and antioxidant depletion. **Chem Res Toxicol**, v. 20, n. 12, p. 1769-77, Dec 2007.

NEGRELLE, R. R. B.; MOROKAWA, R.; RIBAS, C. P. *Vochysia* Aubl. do Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 29, n. 1, p. 10, 2007.

NEMETH, T.; MOCSAI, A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. **Immunology Letters**, v. 143, n. 1, p. 9-19, Mar 30 2012.

NESTLE, F. O. et al. Skin immune sentinels in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 10, p. 679-91, Oct 2009.

NETO, F. C. et al. Vochysiaceae: secondary metabolites, ethnopharmacology and pharmacological potential. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, p. 16, 2011.

NEURATH, M. F.; FINOTTO, S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 22, n. 2, p. 83-9, Apr 2011.

NICKOLOFF, B. J.; QIN, J. Z.; NESTLE, F. O. Immunopathogenesis of psoriasis. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 33, n. 1-2, p. 45-56, Oct 2007.

NIEMAN, L. K. Consequences of systemic absorption of topical glucocorticoids. **J Am Acad Dermatol**, v. 65, n. 1, p. 250-2, Jul 2011.

NOLDNER, M.; SCHOTZ, K. Rutin is essential for the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* extracts in the forced swimming test. **Planta Med**, v. 68, n. 7, p. 577-80, Jul 2002.

OLIVEIRA, S. G. et al. An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. **J Ethnopharmacol**, v. 140, n. 2, p. 428-37, Mar 27 2012.

OTUKI, M. F. et al. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. **Eur J Pharmacol**, v. 507, n. 1-3, p. 253-9, Jan 10 2005.

PANG, G. et al. GM-CSF, IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression and cytokine production in human duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide, IL-1 alpha and TNF-alpha. **Clin Exp Immunol**, v. 96, n. 3, p. 437-43, Jun 1994.

PAQUET, P.; PIERARD, G. E. Interleukin-6 and the skin. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 109, n. 4, p. 308-17, Apr 1996.

PINTO, A. C. et al. Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. S1, p. 16, 2002.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J. M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 12, p. 1063-72, Dec 2008.

RATES, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-13, May 2001.

REUTER, J.; MERFORT, I.; SCHEMPP, C. M. Botanicals in dermatology: an evidence-based review. **Am J Clin Dermatol**, v. 11, n. 4, p. 247-67, 2010.

REVEILLE, J. D.; XIMENES, A.; WARD, M. M. Economic considerations of the treatment of ankylosing spondylitis. **Am J Med Sci**, v. 343, n. 5, p. 371-4, May 2012.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. **N Engl J Med**, v. 353, n. 16, p. 1711-23, Oct 20 2005.

RICKLI, H. C. **Propagação de Guaricica (*Vochysia bifalcata* Warm.) por sementes e estaquia caular.** 2012. 102 (Doutorado). Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ROCHA, M. E. N.; SANTOS, C. L. O uso comercial e popular do eucalipto *Eucalyptus globulus* Labill - Myrtaceae. **Saúde e Ambiente em Revista**, v. 2, n. 2, p. 12, 2007.

SAAG, K. G. Short-term and long-term safety of glucocorticoids in rheumatoid arthritis. **Bull NYU Hosp Jt Dis**, v. 70 Suppl 1, p. 21-5, 2012.

SABAT, R. et al. Immunopathogenesis of psoriasis. **Exp Dermatol**, v. 16, n. 10, p. 779-98, Oct 2007.

SANTOS-OLIVEIRAI, R.; COULAUD-CUNHAI, S.; COLAÇOI, W. Review of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribution to the studies of pharmacological properties. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2b, p. 10, 2009.

SARACENO, R. et al. TNF-alpha antagonists and nail psoriasis: an open, 24-week, prospective cohort study in adult patients with psoriasis. **Expert Opin Biol Ther**, Nov 16 2012.

SARNES, E. et al. Incidence and US costs of corticosteroid-associated adverse events: a systematic literature review. **Clin Ther**, v. 33, n. 10, p. 1413-32, Oct 2011.

SCHACKE, H.; DOCKE, W. D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacol Ther**, v. 96, n. 1, p. 23-43, Oct 2002.

SHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1813, n. 5, p. 878-88, May 2011.

SCHOEPE, S. et al. Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy. **Exp Dermatol**, v. 15, n. 6, p. 406-20, Jun 2006.

SCHON, M. P.; BOEHNCKE, W. H. Psoriasis. **N Engl J Med**, v. 352, n. 18, p. 1899-912, May 5 2005.

SECOLI, S. R. Interações medicamentosas: fundamentos para a pratica clínica da enfermagem. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 35, n. 1, p. 7, 2001.

SEELIGER, S. et al. Proinflammatory role of proteinase-activated receptor-2 in humans and mice during cutaneous inflammation in vivo. **FASEB J**, v. 17, n. 13, p. 1871-85, Oct 2003.

SHAW, D. et al. Pharmacovigilance of herbal medicine. **J Ethnopharmacol**, v. 140, n. 3, p. 513-8, Apr 10 2012.

SOLARO, C.; TRABUCCO, E.; MESSMER UCCELLI, M. Pain and multiple sclerosis: pathophysiology and treatment. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 13, n. 1, p. 320, Jan 2013.

SORRELL, J. M.; CAPLAN, A. I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. **J Cell Sci**, v. 117, n. Pt 5, p. 667-75, Feb 15 2004.

SOUZA-FORMIGONI, M. L. et al. Antiulcerogenic effects of two Maytenus species in laboratory animals. **J Ethnopharmacol**, v. 34, n. 1, p. 21-7, Aug 1991.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. **Life Sci**, v. 67, n. 5, p. 477-502, Jun 23 2000.

STANLEY, P. L. et al. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacol**, v. 4, n. 4, p. 262-71, 1991.

TERUI, T.; OZAWA, M.; TAGAMI, H. Role of neutrophils in induction of acute inflammation in T-cell-mediated immune dermatosis, psoriasis: a neutrophil-associated inflammation-boosting loop. **Experimental Dermatology**, v. 9, n. 1, p. 1-10, Feb 2000.

TIAN, X. Y.; LIU, L. Drug discovery enters a new era with multi-target intervention strategy. **Chin J Integr Med**, v. 18, n. 7, p. 539-42, Jul 2012.

TONEL, G.; CONRAD, C. Interplay between keratinocytes and immune cells--recent insights into psoriasis pathogenesis. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 41, n. 5, p. 963-8, May 2009.

TREMEZAYGUES, L.; REICHRATH, J. Vitamin D analogs in the treatment of psoriasis: Where are we standing and where will we be going? **Dermatoendocrinol**, v. 3, n. 3, p. 180-6, Jul 2011.

VAN DE KERKHOF, P. C. et al. Psoriasis of the face and flexures. **J Dermatolog Treat**, v. 18, n. 6, p. 351-60, 2007.

VANDEVYVER, S. et al. New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. **Endocrinology**, v. 154, n. 3, p. 993-1007, Mar 2013.

VIANNA, M. C. Vochysiaceae na Reserva Biológica de Poço das Antas, Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 57, n. 3, p. 8, 2006.

WENIGER, B. et al. Bioactive triterpenoids from *Vochysia pacifica* interact with cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme PDE4. **Phytother Res**, v. 19, n. 1, p. 75-7, Jan 2005.

WERNER, S.; KRIEG, T.; SMOLA, H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. **J Invest Dermatol**, v. 127, n. 5, p. 998-1008, May 2007.

WILLIAMS, I. R.; KUPPER, T. S. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. **Life Sci**, v. 58, n. 18, p. 1485-507, 1996.

WILMER, J. L. et al. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin. **J Invest Dermatol**, v. 102, n. 6, p. 915-22, Jun 1994.

WINK, M. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multi-component mixtures used in phytomedicine. **Curr Drug Metab**, v. 9, n. 10, p. 996-1009, Dec 2008.

ZELOVA, H.; HOSEK, J. TNF-alpha signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. **Inflamm Res**, v. 62, n. 7, p. 641-51, Jul 2013.

ZHANG, J. et al. Quality of herbal medicines: challenges and solutions. **Complement Ther Med**, v. 20, n. 1-2, p. 100-6, Feb-Apr 2012.

ANEXOS

ANEXO 1	- PUBLICAÇÕES.....	129
---------	--------------------	-----

PUBLICAÇÕES

Os resultados do presente trabalho estão parcialmente submetidos à publicação em:

Horinouchi, CDS, Soley, BS, Mendes, DAGB, Ferreira, BGA, Silva, CM, Zuffellato-Ribas, KC, Cabrini, DA, Otuki, MF. Biological activity for a reforestation species: Topical anti-inflammatory effect of *Vochysia bifalcata* Warm. Applied Biochemistry and Biotechnology.

Outros trabalhos publicados durante o período do doutorado:

Horinouchi, CDS, Otuki, MF. Botanical Briefs: Comfrey (*Symphytum officinale*). Cutis. 91:225-228, 2013.

Campos PM, **Horinouchi CD**, Prudente AD, Cechinel-Filho V, Cabrini DD, Otuki MF. Effect of a *Garcinia gardneriana* (Planchon and Triana) Zappi hydroalcoholic extract on melanogenesis in B16F10 melanoma cells. Journal of Ethnopharmacology. 148(1):199-204, 2013.

Horinouchi, CDS, Mendes DA, Soley BD, Pietrovski EF, Facundo VA, Santos AR, Cabrini DA, Otuki MF. Combretum leprosum Mart. (Combretaceae): Potential as an antiproliferative and anti-inflammatory agent. Journal of Ethnopharmacology. 145(1):311-9, 2012.

Adami, M, Prudente, AS, Mendes, DAGB, **Horinouchi, CDS**, Cabrini, DA, Otuki, MF. Simvastatin ointment, a new treatment for skin inflammatory conditions. Journal of Dermatological Science (Amsterdam). 66(2):127-35, 2012.

Moreira, CG, **Horinouchi, CDS**, Souza-Filho, CS, Campos, FR, Barison, A, Cabrini, DA, Otuki, MF. Hyperpigmentant activity of leaves and flowers extracts of *Pyrostegia venusta* on murine B16F10 melanoma. Journal of Ethnopharmacology, 141(3):1005-11, 2012.

Mendes, DAGB, **Horinouchi, CDS**, Prudente, AS, Soley, BS, Assreuy, J, Otuki, MF, Cabrini, DA. In vivo participation of nitric oxide in hyperproliferative epidermal phenomena in mice. European Journal of Pharmacology, 687(1-3):1-8, 2012.

Cabrini, DA, Moresco, HH, Imazu, P, **Silva, CD**, Pietrovski, EF, Mendes, DAGB, Prudente, AS, Pizzolatti, MG, Brighente, IMC, Otuki, MF. Analysis of the Potential Topical Anti-Inflammatory Activity of *Averrhoa carambola* L. in Mice. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Print), 2011.

Otuki, MF, Bernardi, CA, Prudente, AS, Laskoski, K, Gomig, F, **Horinouchi, CDS**, Guimarães, CL, Ferreira, J, Delle-Monache, F, Cechinel-Filho, V, Cabrini, DA. *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi. (Clusiaceae) as a Topical Anti-inflammatory Alternative for Cutaneous Inflammation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* (Print), 109:56-62, 2011.

Otuki, MF, Reis, RC, Cabrini, D, Prudente, AS, **Horinouchi, CDS**, Correr, CJ. Patient-reported outcomes in psoriasis research and practice. *British Journal of Dermatology* (1951. Print), 165(6):1361-2, 2011.

Rauh, LK, **Horinouchi, CDS**, Loddi, AMV, Pietrovski, EF, Neris, R, Souza-Fonseca-Guimarães, F, Buchi, DF, Biavatti, MW, Otuki, MF, Cabrini, DA. Effectiveness of *Vernonia scorpioides* ethanolic extract against skin inflammatory processes. *Journal of Ethnopharmacology*, 138:390-397, 2011.